

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION CONCERNING SUBMISSION OR TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT

(PCT Administrative Instructions, Section 411)

To:

LEE, Cheo Young
11th Floor Won Bldg.,
648-26, Yeoksam-dong, Gangnam-gu
Seoul 135-080
RÉPUBLIQUE DE CORÉE

Date of mailing (day/month/year) 13 March 2006 (13.03.2006)	
Applicant's or agent's file reference PP-B0180	IMPORTANT NOTIFICATION
International application No. PCT/KR2005/003660	International filing date (day/month/year) 02 November 2005 (02.11.2005)
International publication date (day/month/year) Not yet published	Priority date (day/month/year) 30 March 2005 (30.03.2005)
Applicant KIM, Jung Moon et al	

- By means of this Form, which replaces any previously issued notification concerning submission or transmittal of priority documents, the applicant is hereby notified of the date of receipt by the International Bureau of the priority document(s) relating to all earlier application(s) whose priority is claimed. Unless otherwise indicated by the letters "NR", in the right-hand column or by an asterisk appearing next to a date of receipt, the priority document concerned was submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b).
- (If applicable)* The letters "NR" appearing in the right-hand column denote a **priority document which, on the date of mailing of this Form, had not yet been received by the International Bureau** under Rule 17.1(a) or (b). Where, under Rule 17.1(a), the priority document must be submitted by the applicant to the receiving Office or the International Bureau, but the applicant fails to submit the priority document within the applicable time limit under that Rule, **the attention of the applicant is directed** to Rule 17.1(c) which provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.
- (If applicable)* An asterisk (*) appearing next to a date of receipt, in the right-hand column, denotes a **priority document submitted or transmitted to the International Bureau but not in compliance with Rule 17.1(a) or (b)** (the priority document was received after the time limit prescribed in Rule 17.1(a) or the request to prepare and transmit the priority document was submitted to the receiving Office after the applicable time limit under Rule 17.1(b)). Even though the priority document was not furnished in compliance with Rule 17.1(a) or (b), the International Bureau will nevertheless transmit a copy of the document to the designated Offices, for their consideration. In case such a copy is not accepted by the designated Office as the priority document, Rule 17.1(c) provides that no designated Office may disregard the priority claim concerned before giving the applicant an opportunity, upon entry into the national phase, to furnish the priority document within a time limit which is reasonable under the circumstances.

<u>Priority date</u>	<u>Priority application No.</u>	<u>Country or regional Office or PCT receiving Office</u>	<u>Date of receipt of priority document</u>
30 March 2005 (30.03.2005)	10-2005-0026246	KR	NR
31 October 2005 (31.10.2005)	10-2005-0103040	KR	13 January 2006 (13.01.2006)

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer

Carlos Roy - Gijsbertus Beijer

Facsimile No. +41 22 740 14 35
Telephone No. +41 22 338 95 61

BEST AVAILABLE COPY

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau(43) International Publication Date
5 October 2006 (05.10.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/104306 A1

(51) International Patent Classification:

C07K 19/00 (2006.01) C07K 14/51 (2006.01)

(21) International Application Number:

PCT/KR2005/003660

(22) International Filing Date:

2 November 2005 (02.11.2005)

(25) Filing Language:

Korean

(26) Publication Language:

English

(30) Priority Data:

10-2005-0026246	30 March 2005 (30.03.2005)	KR
10-2005-0103040	31 October 2005 (31.10.2005)	KR

(71) Applicants and

(72) **Inventors:** KIM, Jung Moon [KR/KR]; 2-901, Sindonga Apt., 44, Myeongil-dong, Gangdong-gu, Seoul 134-070 (KR). KIM, Jung Kook [KR/KR]; 101-2401, LG Hangang Xi Apt., 430, Ichon 1(il)-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-031 (KR). KIM, Tae Han [KR/KR]; 903, A-dong, Adenaruche, 170-1, Jeongja-dong, Bundang-gu., Seongnam-si, Gyeonggi-do 463-010 (KR). LEE, Jong Suk [KR/KR]; 104-1903, Samsung Raemian Apt., 91-5, Dogok-dong, Gangnam-gu., Seoul 135-270 (KR).

(72) Inventor; and

(75) **Inventor/Applicant (for US only):** YOON, Jong In [KR/KR]; 1-101, Yurim-billa, 1-226, Hannam-dong, Yongsan-gu, Seoul 140-210 (KR).

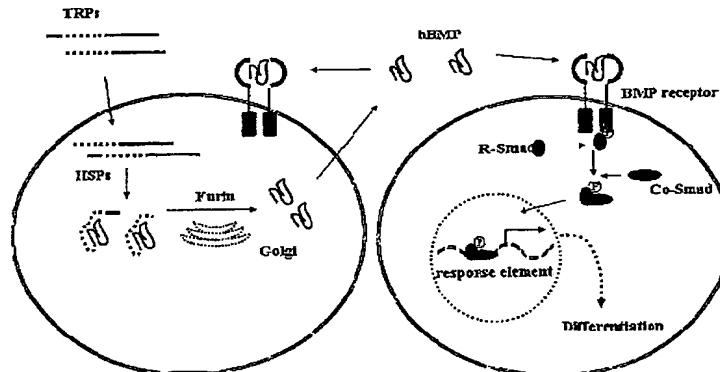
(74) **Agent:** LEE, Cheo Young; 11th Floor Won Bldg., 648-26, Yeoksam-dong, Gangnam-gu, Seoul 135-080 (KR).

(81) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of national protection available):** AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Designated States (unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available):** ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT,

[Continued on next page]

(54) **Title:** NON-ACTIVATED POLYPEPTIDES HAVING A FUNCTION OF TISSUE REGENERATION AND METHOD FOR PREPARING THE SAME



(57) **Abstract:** Non-activated tissue-regeneration polypeptides (TRPs) and the preparation methods thereof are disclosed. The TRPs contain: a protein transduction domain (PTD) making the polypeptides to permeate a cell membrane without cell membrane receptors; a furin activation domain (FAD) which has at least one proprotein convertase cleavage site and which can be cleaved by the proprotein convertase and activate a tissue regeneration domain (TRD) in cells; and a tissue regeneration domain (TRD) which can be activated by the proprotein convertase cleavage of the FAD to stimulate the growth or formation of tissues or to induce the regeneration of tissues. The TRPs can be practically mass-produced by the culture of bacteria, such as recombinant E. coli, and are in a non-activated state before in vivo administration. Thus, their production cost is only a few tenths of the prior active proteins having uses similar thereto, and processes for their separation, purification, handling, storage and administration are significantly simple and convenient. The in vivo administration of the TRPs can stimulate the formation or regeneration of tissues, such as bones or cartilages, or improve the fibrosis and cirrhosis of organs, such as kidneys, liver, lungs and heart by pharmacological mechanisms completely different from those of prior rhBMPs or TGF- β proteins. Accordingly, the TRPs will be useful as drugs having new mechanisms.

**NON-ACTIVATED POLYPEPTIDES HAVING A FUNCTION OF TISSUE
REGENERATION AND METHOD FOR PREPARING THE SAME**

5

TECHNICAL FIELD

The present invention is related to non-activated tissue-regenerative polypeptides (TRPs) and the methods for preparing the TRPs, the tissue regenerative
10 polypeptides, which contain: a protein transduction domain (PTD) making the polypeptides to permeate a cell membrane without cell membrane receptors; a furin activation domain (FAD) which has at least one proprotein convertase cleavage site and which can be cleaved by the proprotein convertase and can activate a non-activated tissue regeneration domain (TRD) in cells; and a non-activated tissue
15 regeneration domain (TRD) which can be activated through the the cleavage of the FAD by the proprotein convertase in cells and which can stimulate the growth or formation of tissues or to induce tissue regeneration.

20

BACKGROUND ART

It is known that bone morphogenetic proteins (BMPs) stimulate the healing of bone defects in mammals or Primates, and particularly are secreted in bone cells to induce bone formation through receptors present in the adjacent cell membranes,
25 when used with collagen or biodegradable polymers in demineralization conditions. The hBMPs are a group of proteins having similarity to each other, and are known to have more than 14 members, including hBMP2 through hBMP15 until now. The hBMP2, 3, 4, 6, 7 and 14 are known to have the medical efficacy of inducing bone regeneration.

30

Among them, the hBMP2 has been known to be the most effective bone morphogenetic protein. There have been a lot of studies on the medical effects and applications of BMP proteins. The BMP7 is known to not only suppress the fibrosis of organs by antagonistic action of TGF- β 1, but also induce the
5 regeneration of organs (*Nature Med.*, 9:964, 2003; *J. Biol. Chem.*, 280:8094, 2005). It is known that the BMP14, (GDF-5, growth/differentiation factor-5: MP-52) shows the function of effectively healing skin wounds and aiding the healing of gastric or duodenal ulcer when administered to human beings or mammals (US 6,764,994; *Nature*, 368:639, 1994; *Exp. Cell Res.*, 235:218, 1997; *Neurosurg Focus*,
10 13:1, 2002; US 6,531,450). In the case of liver or kidney cirrhosis, the BMPs are also known to antagonize TGF- β to inhibit the formation of fibrous tissue and induce the recovery of normal tissue. Namely, the BMPs may function not only to stimulate the formation of bones or cartilages but also to regenerate the skin or regenerate gastrointestinal tissue, unlike the terminological definition of BMP.

15

As an old method for preparing BMPs, a method of extracting BMPs from demineralized animal bone tissue using natural salt (US 4,294,753) has been attempted, but the method has problems in that the preparation efficiency is too low for mass production. A method was developed in early 1990s for separating and
20 purifying the active recombinant hBMP2 after culturing CHO cells transformed with a BMP gene (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2220, 1990). Since then, the mass production of BMPs has been possible (US 4,968,590; 5,106,626; 5,106,748; 5,166,058; 5,187,076; 5,187,623; 5,208,219; 5,258,494; 5,266,683; 5,284,756; 5,399,346; and 6,593,109).

25

However, the methods for preparing recombinant hBMP2 and hBMP7 using the transformed CHO cells have problems in that the culturing of a large amount of CHO cells is required to obtain enough amount of active rhBMP2 or rhBMP7. The separation and purification steps are very complicated, and the production cost
30 is very high. Also, these methods have a common problem that the biological

activity of the proteins is reduced during the separation, purification, storage, medication and/or administration processes. To improve a part of the shortcomings of these methods of preparing recombinant BMPs by culturing animal cells, Biopharm company recently developed a method for preparing
5 rhBMP14(MP-52) by culturing recombinant *E. coli* at lower cost (US 2003/0181378; WO 96/33215). In this method of preparing the rhBMP14, however, the step of separating and purifying rhBMP14 in the form of an activated protein is still complicated and inconvenient. The problem of activity reduction of the prepared *E.coli* recombinant protein has still not been solved for the separation,
10 purification, storage, handling, and/or administration steps.

Moreover, in producing active BMPs in recombinant *E. coli* as in the case of the prior Biopharm's method, there is a limitation on the selection and designing of the biochemical structures of BMPs. Even if it is possible to prepare a protein having
15 the structure like rhBMP14, using the Biopharm's method, it shall not be possible to practically prepare the BMPs having similar biochemical structures like active rhBMP2, rhBMP4, rhBMP7, etc.

In the case of rhBMP-2, which is commercially available and is medically used for,
20 e.g., spine fusion, it is being sold for as high as several thousand US dollars per mg in the year 2005. Despite that the rhBMPs have various latent potencies for numerous patients who need spine fusion operations, or who need regenerating gastric ulcer or liver cirrhosis, the clinical application of BMPs has been limited because of the extremely high cost and the inconveniencies and activity loss in the
25 storage, handling and administration.

Accordingly, in the art, there has been an urgent and strong need for the development of new kinds of biochemical drug substances which would provide equal or higher biomedical efficacy than those of rhBMPs or TGF- β s, and which
30 can be produced at significantly lower costs than those for previously known

pharmacological mechanisms. Specifically the TRPs permeate cell membranes without help from receptors. They are cleaved by furin in cells and then activated. The activated proteins are secreted out of the cells in large amount, and then they stimulate cell membrane receptors for bone formation or tissue regeneration. On
5 the basis of these new findings, the present invention has been completed.

SUMMARY OF THE INVENTION

10 A primary object of the present invention is to provide non-activated TRPs having biochemical structures, characteristics and pharmacological mechanisms that are completely different from the previously known active rhBMP proteins. The new non-activated TRPs are designed so that they can be administered directly into the human body to stimulate the formation or regeneration of bones and cartilages or to
15 improve the fibrosis and cirrhosis of organs, such as kidneys, liver, lungs and heart, and ultimately to induce tissue regeneration. The present invention also provides practical production and preparation methods for the TRPs.

Another object of the present invention is to provide a new drug composition for
20 stimulating the formation or regeneration of tissues, such as bones and cartilages, or a new drug composition for improving the fibrosis or cirrhosis of organs, such as kidneys, liver, lungs and heart, the composition containing said non-activated TRPs.

To achieve the above objects, in one aspect, the present invention provides a non-
25 activated tissue-regeneration polypeptides (TRPs) containing: (a) a protein transduction domain (PTD) making the polypeptides to permeate cell membranes without cell membrane receptors; (b) a furin activation domain (FAD) which has at least one proprotein convertase cleavage site and which can be cleaved by the proprotein convertase and can activate a non-activated tissue regeneration domain
30 (TRD) in cells; and (c) a non-activated TRD which can be activated *in vivo* by the

proprotein convertase cleavage of the FAD. The *in vivo* activated proteins are designed to stimulate the growth or formation of tissues or to induce the regeneration of tissues.

- 5 In another aspect, the present invention provides a recombinant vector inserted with an FAD-encoding base sequence in front of the 5' region of TRD-encoding DNA, a PTD base sequence, a base sequence for tagging, and at least four histidine-encoding base sequences for separation and purification. The present invention also provides bacteria transformed with the said recombinant vectors.

10

- In still another aspect, the present invention provides a method for preparing non-activated TRPs, comprising the steps of: (a) culturing the said transformed bacteria to express a [PTD-FAD-TRD] polypeptide; and (b) centrifuging the culture broth, and then removing the two-dimensional or three-dimensional structure of the polypeptides or converting the two-dimensional or three-dimensional structure to one-dimensional linear structure by addition of a urea solution into the supernatant and cell pellet, and then purifying the [PTD-FAD-TRD] polypeptide..
- 15

- In the present invention, the proprotein convertase may preferably be furin but is not limited thereto. Examples thereof include PC7, PC5/6A, PC5/6B, PACE4, PC1/3, PC2 and PC4.
- 20

- Also, the TRD may preferably be represented by an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 13, but is not specifically limited if it is a secreted protein showing the activity to stimulate the growth or formation of tissue or to induce tissue regeneration following the furin cleavage. Examples thereof include polypeptides such as BMPs, TGF- β , β -NGF (β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs (matrix metalloproteinases), and insulin-like growth factor (IGF-1).
- 25

30

The FAD may preferably be represented by an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14 to 26, but is not specifically limited if it has a proprotein convertase cleavage site and if it can be cleaved by the proprotein convertase in cells to activate the TRD. Also, the PTD may preferably be selected
5 from the group consisting of TAT, drosophila melanogaster-derived Antp peptide, VP22 peptide and mph-1-btm, but is not limited thereto.

In the inventive method for preparing the non-activated TRPs, the purification step may preferably comprise the sub-steps of binding the polypeptides to nickel-
10 titanium beads, washing the beads with the same solution, and then eluting the beads with imidazole and a high-salt buffer solution, but is not limited thereto.

The non-activated TRPs according to the present invention have no three-dimensional stereoregularity that are possessed in common by the previously known
15 active BMPs. The TRPs are not biologically active by themselves yet before administered into patients. When the non-activated TRPs are administered to the human beings or mammals, however, the proprotein convertase cleavage sites of FAD in the TRPs are cleaved by proprotein convertase present in living cells, whereby TRD is activated, and the activated TRD is secreted out of the cells,
20 thereby showing the desired tissue regeneration potencies. The TRPs according to the present invention are preferably in the form of a fusion polypeptide of PTD, FAD and TRD. The inventive TRPs have a function to stimulate the formation or regeneration of tissues, such as human bones and cartilages, or to improve the fibrosis or cirrhosis of organs, such as kidneys, liver, lungs and heart, and ultimately
25 to induce the regeneration of original tissue.

Accordingly, the present invention provides a new drug composition which contains the non-activated TRP as an active ingredient and which stimulates the formation or regeneration of tissue by new pharmacological mechanisms completely different
30 from those of previously known protein medicines having uses similar thereto. In

- the present invention, the tissues may preferably be bone or cartilage. Furthermore, the present invention provides a new drug composition for improving the fibrosis or cirrhosis of organs, which contains the non-activated TRP as an active ingredient. The inventive composition may suitably contain, in addition to TRP, other growth
- 5 factors, such as TGF- β (transforming growth factor- β), IGF (insulin-like growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), and FGF (fibroblast growth factor), in which case the therapeutic effect of the composition can be significantly increased.
- 10 Other features and embodiments of the present invention will be more clearly understood from the following detailed description and accompanying claims.

BRIEF DESCRIPTION OF DRAWINGS

15

FIG. 1 shows a structural schematic diagram of human BMP2, BMP7 and TGF- β proteins and the total amino acid sequence thereof.

FIG. 2 is a photograph showing the two-dimensional and three-dimensional

20 structures of previously commercially available rhBMP-2.

FIG. 3 shows a process for the preparation, separation and purification of TRP-1 according to the present invention.

25 FIG. 4 shows a process for the preparation, separation and purification of the previously known rhBMP.

FIG. 5 shows the pharmacological mechanism of the previous rhBMP.

FIG. 6 shows the pharmacological mechanisms of the non-activated TRPs prepared according to the present invention.

FIG. 7 shows a recombinant expression vector having TAT bound to an hBMP2
5 gene.

FIG. 8 shows electrophoresis photographs of a total protein before and after inducing protein expression by IPTG during the culture of *E. coli* transformed with the recombinant expression vector shown in FIG. 7.

10

FIG. 9 shows the results of Western blot analysis for TAT-BMP2 using an anti-Xpress antibody.

FIG. 10 is a Western blot photograph showing that TAT-BMP2 permeates cell
15 membranes to transduce into the cells.

FIG. 11 is a photograph showing the alkaline phosphatase (ALP) activity of TAT-BMP2.

20 FIG. 12 is a photograph showing that fibroblasts treated with TAT-BMP2 and commercially available rhBMP-2 were subjected to von Kossa staining to examine the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances.

FIG. 13 is a schematic diagram of TRP-1 variant designed to examine a furin
25 activation mechanism, which shows that a signal peptide, expected to regulate the post-translational modification, and a pro-domain, activated by furin, are bound to BMP2.

FIG. 14 is a Western blot photograph showing that the inventive TRP-1 and its
30 variant permeate cell membranes to transduce into the cells.

FIG. 15 is a photograph showing that the inventive TRP-1 is cleaved by furin *in vitro*.

- 5 FIG. 16 shows the results of Western blot analysis using α 1-PDX and anti-X-press, which indicate that the inventive TRP-1 is activated by furin in cells.

FIG. 17 shows measurement results for ALP activity in fibroblasts treated with the inventive TRP-1 and its variants.

10

FIG. 18 shows that fibroblasts treated with the inventive TRP-1 and its variants were subjected to von Kossa staining to examine the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances.

- 15 FIG. 19 shows electrophoresis photographs of a total protein before and after inducing TRP-1 and TRP-2 expressions by IPTG during the culture of the inventive recombinant *E. coli*.

- FIG. 20 shows the results of Western blot analysis for the inventive TRP-1 and
20 TRP-2 using an anti-X-press antibody.

FIG. 21 illustrates the results of Western blot analysis using an anti-X-press antibody, which show the process of the inventive TRP-1 being introduced into cells.

25

FIG. 22 illustrates the results of Western blot analysis using an anti-X-press antibody, which show the process of the inventive TRP-2 being introduced into cells.

FIG. 23 illustrates the results for Western blot analysis conducted to examine the secretion of activated hBMP2 in fibroblasts treated with the inventive TRP-1.

FIG. 24 shows that fibroblasts treated with the inventive TRP-1 and commercially
5 available rhBMP-2 were subjected to von Kossa staining to examine the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances.

FIG. 25 shows measurement results for ALP activity in fibroblasts treated with the inventive TRP-1 and commercially available rhBMP-2.

10

FIG. 26 shows that fibroblasts treated with the TRP-1 and rhBMP-2 at various concentrations were subjected to von Kossa staining to examine the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances.

15 FIG. 27 shows the results of Western blot analysis using an anti-X-press antibody, which indicate the half-life of the inventive TRP-1 introduced into cells.

FIG. 28 is a confocal microphotograph showing observation results for the intracellular permeation and temperature effect of the inventive TRP-1 and TRP-2.

20

FIG. 29 is a photograph showing that the inventive TRP-1 and TRP-2 specifically bind to F-actin after permeation into cells.

FIG. 30 is a photograph showing that the formation of bones is induced in test
25 animals administered with the inventive TRP-1.

FIG. 31 shows the comparison of cytotoxicity between the inventive TRP-1 and the prior commercially available rhBMP-2.

30

DETAILED DESCRIPTION OF THE INVENTION, AND PREFERRED EMBODIMENTS THEREOF

The non-activated TRPs according to the present invention have the biochemical
5 structures and characteristics completely different from those of previously known
active proteins, such as rhBMPs or TGF- β . Namely, the inventive non-activated
TRPs have no biological activity by themselves before *in vivo* administration,
whereas previously known rhBMPs and TGF- β proteins are in a biochemically
activated state and have three-dimensional structures as shown in FIG. 1 and FIG. 2
10 (*Eur. J. Biochem.*, 237:295, 1996; *J. Mol. Biol.*, 287:103, 1999).

Thus, the preparation of prior activated rhBMPs and TGF- β has a common
problem in that it should rely on the culturing of recombinant animal cells, having a
significantly low productivity, such as CHO cells. As in the case of rhBMP14
15 (MP-52) prepared by BioPharm, some of rhBMPs are prepared by the culturing of
recombinant *E. coli* having high productivity than the animal cells, in which case
many limitations are imposed on the biochemical structure of BMP to be prepared.
Namely, active MP-52 may be prepared using the recombinant *E. coli*, but other
kinds of active BMPs, such as rhBMP2, rhBMP4 and rhBMP7 or active TGF- β
20 can not be prepared using the recombinant *E. coli*.

Meanwhile, US 2004/197867 A1 discloses a fusion polypeptide of a bone
morphogenetic polypeptide and a protein transduction domain (PTD), and a method
for inducing bone formation in animals by administering the fusion polypeptide.
More specifically, said patent discloses that administering a fusion polypeptide of
25 inexpensive LMP-1 (LIM mineralization protein-1) and PTD instead of directly
administering expensive BMP induces the mRNA expression of BMP2 and BMP7,
and also said patent mentions, as bone morphogenetic proteins, not only LMP but
also BMP, TGF- β , SMAD, etc. However, it is well known that, even if mRNAs
are formed in cells, proteins are not formed from numerous mRNAs due to the
30 regulation and interference of mRNAs by micro RNAs (*Nature*, 409:363, 2001; *Cell*,

115:199, 2003). Therefore the contention that the increase of BMP mRNAs by LMP-1 is a critical factor for the differentiation of bone cells lacks credibility. In addition, even if PTD is used to introduce proteins into cells, it cannot be said that all the proteins are activated to show the expected bone morphogenetic potencies
5 (*Curr. Protein Peptide Sci.*, 4:97, 2003). Particularly in the case of secretory proteins, such as BMPs, the pharmacological activities can be shown only through a series of complicated post-translational modification processes, unlike other kinds of proteins showing biomedical potencies of nuclear and cytoplasmic protein in the cells.

10

Particularly, the BMPs work by the pharmacological mechanisms and activation mechanisms completely different from those of LMPs which is probably a nuclear transcription factor. Therefore it is not predictable at all before appropriate experimental analyses that the simple replacement of LMP-1 with BMP can show
15 the biomedical effects similar to those obtained from LMP-TAT. If PTD is used to introduce recombinant proteins into cells as in the case of US 2004/197867 A1, LMP-1 or SMAD may be activated to function as a gene regulatory factor, whereas BMP and TGA- β may show completely different behavior than from the case of LMP or SMAD. It is because the BMPs and TGF- β belong to secretory proteins,
20 unlike LMPs (*Genes Dev.*, 15:2797, 2001; *J. Cell Biol.*, 144:139, 1999; *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 4:97, 2003; *Nature*, 425:577, 2003). In other words, the BMPs and TGF- β proteins cannot show the expected biomedical potencies without highly complicated post-translational activation processes (e.g., intracellular processing and modification), unlike LMPs. Therefore it cannot be expected that, the PTD
25 simply bound to BMPs would show the desired biological activities when it is administered *in vivo*. Unfortunately, the US 2004/197867 A1 does not mention any experimental evidence showing that bone formation is stimulated by the introduction of a fusion polypeptide of BMP and PTD. It does not rationalize either that the administration of BMP-PTD, instead of rhBMP, could provide any
30 additional or differential effects than administration of prior rhBMPs.

The present inventors have found that the primary factor of the lack of efficiency in administering the previously known rhBMPs into living human beings or mammals is due to their biochemical activity and the three-dimensional steric structure. The production cost of the rhBMP becomes extremely high because of the biochemical activity of the BMPs. The low-productive animal cell culturing is preferred due to the activation of the BMPs. The separation, purification, storing, handling, and administration of the BMPs become inefficient and expensive, because the biological activity of BMPs is maintained even before administration.

Based on this finding, the present inventors first attempted to prepare a non-activated polypeptide showing no three-dimensional stereoregularity at room temperature. Namely, in order to make the non-activated polypeptide to permeate cell membranes without cell membrane receptors, the non-activated polypeptides were fused with PTDs, such as TAT, and examined for permeation into cells. An inactivated BMP-TAT fusion polypeptide having no three-dimensional steric structure was prepared in this manner and was administered into cells. As shown by the Example 1 below, the fusion polypeptide of BMP-TAT, for example, easily permeate through the cell membranes, as expected, when administered into mammal cells. However, the permeated BMP-TAT does not show any biochemical activity, nor pharmacological efficacies associated with the stimulation of bone or cartilage formation or regeneration.

To additionally solve this problem, the present inventors have developed a practical method making the non-activated polypeptide to be activated, when administered into the human body, by proprotein convertase, such as furin, which is present in cells. Namely, we prepared a polypeptide (TRP) containing: PTD making the polypeptide to permeate cell membranes without cell membrane receptors of, e.g., human beings and mammals; FAD making the non-activated protein to be activated in cells by *in vivo* proprotein convertase, such as furin; and TRD being able to be activated to function to induce tissue growth or regeneration. The TRD

can function to stimulate the formation or regeneration of bones or cartilages or improve the fibrosis and cirrhosis of kidneys, liver, lungs and heart, when permeated into animal cells by help of PTD and activated *in vivo* by the FAD. We have found that the above-prepared polypeptide not only permeates cell membranes
5 but also is activated *in vivo* and then secreted to exhibit the effect of stimulating tissue growth or regenerating tissue.

The TRPs according to the present invention can be mass-produced in a practical manner through culturing bacteria, such as recombinant *E. coli*, without limitations
10 caused by the biochemical structure of the proteins. They are maintained in a biochemically inactive state before *in vivo* administration. For this reason, their production cost is only a few tenths of the costs of previously known activated proteins (rhBMPs, TGF- β proteins, etc.) having uses similar thereto. The processes for separation, purification, handling, storage and administration of the
15 present inventive TRPs are significantly simpler and more convenient than those of prior active rhBMP proteins.

Unlike that the prior active BMPs had limitations on their preparation methods, the present invention has an advantage in that TRPs, which include BMPs and TGF- β
20 proteins having various structures as TRDs, can be prepared using recombinant *E. coli* in a practical and inexpensive manner (see FIG. 3). FIG. 3 shows a process for separating and purifying TRP-1 according to the present invention, and FIG. 4 shows a process for separating and purifying rhBMPs according to the prior art (US 4,968,590; 5,106,626; 5,106,748; 5,166,058; 5,187,076; 5,187,623; 5,208,219;
25 5,258,494; 5,266,683; 5,284,756; 5,399,346; and 6,593,109). As shown in the figures, the prior method includes a complicated separation and purification process and shows low purification yield because it comprises producing and secreting BMPs through the culture of transformed CHO cells. It shows very low purification yield to separate and to purify prior BMPs from a large culture medium
30 by using herarin sepharous column, and the like. The inventive method has

advantages in that it needs a very simple separation and purification process and in that it provides high purification yield. Namely TRP-1 according to the present invention is, unlike previously known rhBMP-2, in a non-activated state until administration into patients, and thus it does not require the culturing of a large
5 amount of CHO cells. It is simple and easy to separate and purify the inventive TRP-1, and its purification yield is significantly higher than that of prior activated rhBMP-2. Accordingly, the non-activated TRPs according to the present invention have advantages in that they can be produced at the cost of a few tenths of that of the prior commercially available rhBMP-2, and in that it is convenient to store and
10 administer the inventive TRPs.

The present invention fundamentally solves the high-cost problem possessed in common by the previously known rhBMPs, and the inefficiency problems associated with the processes of separation, purification, storage and administration
15 of the active rhBMP products. Also, it was found that the non-activated polypeptides have new pharmacological mechanisms completely different from those of the prior rhBMPs, when administered directly into living human beings or mammals. The inventive TRPs show equal or better biomedical efficacies on the stimulation of tissue formation or the regeneration of tissue comparing with the
20 previously known rhBMPs or TGF- β .

The non-activated TRPs according to the present invention have pharmacological mechanisms completely different from those of the previously known active rhBMPs, TGF- β , and the like. That is, when the non-activated TRPs according to
25 the present invention are administered *in vivo* to human beings or mammals, they can stimulate the formation of bones or cartilages or improve the fibrosis or cirrhosis of kidneys, liver, lungs and heart, according to pharmacological mechanisms completely different from those of previously known rhBMPs or TGF- β proteins. For example, the prior rhBMPs, as shown in FIG. 5, bind to native
30 receptors from cells and induce the differentiation of bone formation cells through

the Smad signaling pathway, whereas the inventive TRPs, as shown in FIG. 6, permeate the cell membranes independently of the receptors and are restructured by HSP, etc., in cells, and the restructured TRPs are cleaved and activated by proprotein convertase, such as furin, which is present in golgi complexes and endosomes, and the activated BMPs are secreted out of the cells, and the secreted BMPs bind to the receptor of autocrine or paracrine cells to induce the differentiation of bone formation cells.

Also, the present invention adopts a therapeutic method completely different from the prior method attempted to induce bone formation. Namely, according to the present invention, a non-activated polypeptide (TRP) consisting of PTD, FAD and TRD is prepared in recombinant bacteria, and the prepared polypeptide is administered to human patients or mammals. The TRP is refolded in cells *in vivo* by HSP (heat shock protein), etc. and is cleaved by furin, etc., so as to be refolded to an activated BMP, which is then secreted extracellularly so as to induce bone formation.

The TRPs according to the present invention are polypeptides containing: PTD making the polypeptide to permeate a cell membrane without cell membrane receptors; FAD having at least one proprotein convertase cleavage site and making non-activated TRD to be activated in cells by cleavage with the proprotein convertase; and non-activated TRD which can be activated in cells by the proprotein convertase cleavage of the FAD and which can stimulate tissue growth, formation or regeneration. The inventive TRPs are inactive by themselves, but after permeation into organisms or cells, the FAD is cleaved by proprotein convertase found in most cells at large amounts so as to activate the TRD, and the activated protein is secreted extracellularly to exhibit tissue regeneration potencies. These TRPs according to the present invention can solve all the problems of the previously known active proteins that are expensive to be produced, not easy to be stored and handled.

In the present invention, a recombinant vector was first prepared by inserting the base sequence of a BMP pro-domain having a furin cleavage site and the base sequence of PTD in front of the 5' region of a BMP gene, and inserting in front
5 thereof a base sequence for tagging, at least four histidine-encoding base sequences for separation and purification, and ATG as an initiation base sequence.

In the present invention, as the BMP gene, a gene encoding hBMP2 set forth in SEQ ID NO: 1 or hBMP7 set forth in SEQ ID NO: 6 was used but not limited
10 thereto. Also, as the FAD, an hBMP2 pro-domain set forth in SEQ ID NO: 14 or an hBMP7 pro-domain set forth in SEQ ID NO: 19 was used but not limited thereto. For example, the pro-domains of other BMPs and TGF- β proteins may also be used without limitations if they have a proprotein convertase cleavage site, such as furin, and can be cleaved by proprotein convertase in cells to activate TRD.

15

Also, as a PTD, TAT (YGRKKRRQRRR: SEQ ID NO: 27) was used in the present invention but is not limited thereto. For example, PTDs, such as drosophila melanogaster-derived Antp peptide, VP22 peptide (Gene Therapy, 8:1, Blackbirch Press, 2001) and mph-1-btm (US 2005/0147971 A1), may also be used. Also, as a
20 tagging base sequence, an X-press tag was used, but Flag, Myc, Ha, GST, etc., may also be used.

To construct the recombinant vector, pRSET, which is resistant to ampicillin and commercially available, was used in the present invention but is not limited thereto.
25 For example, a bacterial vector having kanamycin as selective marker, a mammalian cell expression vector, such as pcDNA, and viral vectors, such as pPGS and pBabe, may also be used.

Then, microorganisms transformed with the recombinant vector were cultured to
30 express the inventive TRPs, and the expressed TRPs were separated and purified.

In the present invention, the transformed *E. coli* may be cultured in a generally used medium, and IPTG is preferably added in order to induce the over-expression of the fusion polypeptides.

- 5 In the present invention, although *E. coli* was used as the transformed microorganisms, it is possible to use other kinds of bacteria, yeasts or molds. Furthermore, only active sites may also be chemically synthesized and used without using microorganisms.
- 10 The fusion polypeptides expressed by the culture of the transformed microorganisms can be isolated using a GST-fusion protein or other conventional methods for protein separation and purification. For example, the TRPs according to the present invention may be purified through inducing the precipitation of the proteins using the concentration gradient of urea or ammonium sulfate and
15 dialyzing the precipitates to remove salts. Also, because the present invention does not require the two-dimensional or three-dimensional structure of the over-expressed polypeptides, it is preferable that the proteins having a two-dimensional or three-dimensional structure are converted to one-dimensional linear structure.
- 20 When the inventive TRPs are administered into, e.g., bone cells, progenitor cells and stem cells, the FAD of the TRPs are cleaved by proprotein convertase, such as furin, to activate TRDs (e.g., BMP), which are then secreted. In other words, the TRPs permeated into cells specifically bind to F-actin in the cells, and recover a three-dimensional structure by factors, such as HSP70, and their furin cleavage sites
25 are cleaved by furin, which is an intracellular cleavage enzyme, to activate TRDs (e.g., BMPs), which are then secreted extracellularly. The inventive TRPs introduced into cells have a half-life of 3-24 hours depending on the type and activity of the cells, indicating that the permeated proteins have activation time which varies depending on the type of cells.

Meanwhile, when the furin cleavage sites were mutated, activated BMPs were not secreted. This suggests that the protein modification by the furin cleavage enzyme is critical to the intracellular processing and activation of the permeated proteins. Also, when hBMP is naturally synthesized and processed *in vivo*, a signal peptide is
5 known to play an important role in the intracellular and activation of proteins. However, even when the signal peptide was deleted in the present invention, the resulting BMP showed effects similar or better than those of wild-type BMP2 in bone formation. This suggests that the transfer of the inventive BMP using TAT and FAD does not require the signal peptide unlike the natural hBMP *in vivo*.

10

When the inventive TRPs are administered to cells at a concentration of more than 0.1 nM, the TRPs transduce into the cells in a concentration-dependent manner and converted into activated BMPs in the cells, and the activated BMPs are secreted out of the cells. The inventive TRPs directly permeated the cell membrane within one
15 hour independently of a BMP receptor present in the cell membrane, and the cell membrane permeation process was found to be temperature-independent, indicating that the permeation process does not require the cell membrane receptor. Also, even when various concentrations of TRPs were administered to cells, cytotoxicity was not observed.

20

As a result, the inventive non-activated TRPs do not need to be maintained in three-dimensional structures, unlike previously known active BMPs, and they permeate bone cells in the form of a one-dimensional linear structure and are converted to active BMPs, and then are secreted out of cells and show tissue regenerative
25 potencies. While the prior hBMPs directly show bone morphogenetic potencies, the inventive TRPs show tissue regenerative potencies through indirect activation *in vivo*. Thus, the inventive non-activated TRPs do not require additional equipment or cost for maintaining a three-dimensional structure, and it is very easy to separate and purify them. Also, the TRPs are produced in simple processes at a low cost,
30 and they provide increased medical efficiency. These advantages suggest that the

inventive TRPs can solve all the problems of the prior rhBMP proteins. The characteristics of the inventive TRPs are shown in Table 1 below in comparison with the prior activated rhBMP2 and rhBMP7 proteins. Table 1 shows the characteristics of processes for the separation, purification, storage and administration of the inventive TRP products in comparison with those of the previously known activated rhBMPs.

Table 1

Items	Prior bone morphogenetic proteins (rhBMP-2 or rhBMP7)	Inventive fusion polypeptides (TRPs)
Production method	Culture transformed CHO cells	Culture transformed <i>E. Coli</i>
	Produce while maintaining transformed CHO cells	Maintain transformed <i>E. coli</i> in a simple manner
	Separate from large cell medium, and concentrate	Separate directly from <i>E. coli</i> , and dilute
Production cost	Very high	Significantly lower than those of the prior art
Production equipment and facilities	Require large-scale equipment and facilities	Very simple
Products	Activated rhBMP2, rhBMP7	Fusion polypeptides of PTD-FAD-TRD
Three-dimensional structure	Active three-dimensional structure (FIG. 1 and FIG. 2)	Non-activated peptides
	Naturally occurring structure	Naturally non-occurring random structure
Solubility in cleaning material and physiological saline	Soluble; Loss of three-dimensional structure and activity	Insoluble; No effect on structure and activity
Need of carrier for administration <i>in vivo</i>	Diffuse rapidly due to water-solubility. Need suitable carrier for local administration	Are insoluble and transducer rapidly into adjacent cells. No need carrier for local administration
Stability of storage	Loss of activity upon breakdown of three-dimensional structure; Not storable above 37°C; low stability of storage	Independent on structure; Storable above 37°C; Good stability of storage
Biological mechanism	Directly bind to cell membrane receptors (direct action)	Activated proteins are secreted out of cells (indirect action)

Intracellular specific structure binding to protein after administration	No relevant data	F-actin
Intracellular processing	No relevant data	Activation by cleavage with furin enzyme
Temperature dependency in administration	Needs live body temperature to be bound to receptors	Permeate all living cells independently of temperature
Half time for activation	No relevant data	3-12 hours
Cytotoxicity	No cytotoxicity at 200 nM concentration	
Function of signal peptide in process for protein activation	Necessary	Not necessary
Cell selectivity	Signal only through BMP receptors	Permeable all kinds of cells without help from receptors
Medical potency	Similar	
Administration mode	Same	

- The inventive non-activated TRPs shall be useful for the treatment of bone diseases. For example, the TRPs can either induce the growth of bones in an environment where bones are not normally formed, or improve bone resorption by bone fracture
- 5 resulting from external injury, or stimulate the fixation of artificial joints. Specifically, the inventive TRPs shall be used for the treatment of congenital anomaly, tumor excision and reconstruction, craniomaxillofacial deformity, periodontal disease, etc., to provide an environment for inducing the differentiation of bone formation cells or stimulating the growth of bone formation cells. In
- 10 addition, the TRPs according to the present invention can be used to prevent the fibrosis of tissues, such as kidneys or liver, and to induce the regeneration of tissues, and may also be used for other applications, such as the regeneration of nerves or blood vessels.
- 15 The non-activated TRPs according to the present invention can be used by themselves or in the form of pharmaceutically acceptable acid-added salts or metal complexes, for example, of zinc or iron salts. Preferable examples of the acid-added salts, which can be used in the present invention, include hydrogen chloride,

hydrogen bromide, sulfate, phosphate, maleate, acetate, citrate, benzoate, succinate, malate, ascorbate, and tartarate.

The inventive composition containing the non-activated TRP as an active ingredient
5 is preferably prepared by mixing and diluting the active ingredient with a pharmaceutically acceptable excipient or matrix carrier or by sealing the active ingredient into a receptacle-like carrier, depending on administration routes and modes and intended therapeutic uses. Moreover, the inventive composition may also be used in combination with other drugs useful for the treatment of bone
10 defects. In this case, the preparation of a physiologically acceptable composition having the desired pH, isotonicity and stability may be performed using any conventional method known in the art to which the present invention pertains. The matrix used in the present invention may be selected depending on bioadhesion, biodegradability, mechanical properties, attractive appearance and contact
15 properties. Examples of the carriers, which can be used in the present invention, include biodegradable and chemical substances, such as calcium sulfate, tricalcium phosphate, hydroxyapatite and polylactic acid; biodegradable and biological substances, such as bone or skin collagens, and other pure proteins or cellular matrix components; non-biodegradable and chemical substances, such as sintered
20 hydroxyapatite, bioglass, aluminate and other ceramics; combinations of the above substances, such as polylactic acid, hydroxyapatite, collagen and tricalcium phosphate. However, the present invention is not limited to the above-mentioned carriers.

25 Examples of excipients, which can be used in the present invention, include lactose, dextrose, sucrose, sorbitol, mannitol, calcium silicate, cellulose, methylcellulose, microcrystalline cellulose, magnesium stearate, polyvinylpyrrolidone, water, methylhydroxybenzoate, propylhydroxybenzoate, talc, and mineral oil.

Meanwhile, the composition containing the non-activated TRP according to the present invention is preferably used in the form of an injection solution or capsule in order for the composition to be introduced into bone defect sites. The dose of the inventive composition can be determined considering the kind of excipients or
5 matrix carriers used, the weight of formed bones, bone injury sites and the condition of injured bones in patients, the patient's age, sex and diet, disease severity, administration period, and other clinical factors. Thus, for example, a conventionally known effective amount of the composition may be administered at one time or in portions, considering the weight of bones, and additional
10 administration can be determined while the growth of bones is observed.

Examples

Hereinafter, the present invention will be described in more detail by examples.
15 However, it will be obvious to those skilled in the art that the present invention is not limited by these examples, and various variations and modifications to these examples are possible without deviating from the spirit and scope of the present invention.

20 Particularly, although the following examples illustrated only hBMP2 and hBMP7 as TRDs contained in TRPs, those skilled in the art will appreciate that it is possible to use not only human BMPs, such as hBMP3, hBMP4, hBMP6, and hBMP14 (MP-52), but also BMPs derived from mammals, such as rats, cattle, pigs, and other animals. Furthermore, those skilled in the art will appreciate that it is possible to
25 use, in addition to BMPs, other kinds of polypeptides, such as a group of TNF- α proteins, including TGF- β , β -NGF (β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase-like), and ectodysplasin-A (Eda-1), a group of MMPs, including MT1-MMP (membrane type-matrix metalloproteinase) and MMP-2, and insulin-like growth factor-1 (IGF-1).

Moreover, although the following examples illustrated only the pro-domains of BMPs, as FADs contained in TRPs, those skilled in the art will appreciate that any pro-domain may be used without limitations if it has a proprotein convertase cleavage site and is cleaved by proprotein convertase in cells to activate TRDs.

5

Example 1: Preparation of [TAT-hBMP2] fusion polypeptide

Each of proteins belonging to a BMP/TGF- β group consists of a dimer comprising the same two peptides linked to each other by one disulfide bond. In this regard, 10 each of the peptides consists of 120-140 amino acids depending on the type of BMPs, one of 7 cystein terminal groups present in BMPs forms a disulfide bond with the same site of the other peptides to form a dimer, and the remaining 6 cysteins form 3 intrachain disulfide bonds in the same amino acids, resulting in a unique three-dimensional structure (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93:878, 1996; *J. Bone* 15 *Joint Surg.*, 83:S1, 2001). Herein, BMP2 consists of 114 amino acids, BMP7 consists of 139 amino acids, and each of TGF- β 2 and β 3 consists of 112 amino acids. FIG. 1 shows the amino acid sequences of these peptides and a schematic diagram of the three-dimensional structure thereof, and FIG. 2 shows the three-dimensional structure of previously known BMP2 (*Eur. J. Biochem.*, 237:295, 20 1996; *J. Mol. Biol.*, 287:103, 1999). The locations of the seven cysteins in BMP/TGF- β are all conserved, suggesting that the cysteins play an important role in the three-dimensional structure.

Accordingly, as well known in the art, when a fusion protein prepared by binding 25 PTD to the previously known hBMP2 is introduced into cells, it is expected that this fusion protein will permeate the cell membrane even without the cell membrane receptor so that it will be refolded into a biologically active protein by, e.g., HSPs (heat shock proteins) (*Nature Med.*, 4:1449, 1998; *Science*, 285:1569, 1999).

For this reason, in this Example, a gene encoding hBMP2 having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 1 was amplified by RT-PCR using the total mRNA of Saos-2 cells (American Type Culture Collection, ATCC HTB-85) as a template with primers of SEQ ID NOs: 28 and 29. For cloning into a bacterial expression
5 vector, a restriction enzyme *Kpn* I site (5'-ggtaac-3') was added to the 5' region of each of the primers. Cloning primers used in Examples below also contained the restriction enzyme *Kpn* I site.

SEQ ID NO: 28: 5'-caa gcc aaa cac aaa cag cgg aaa-3'

SEQ ID NO: 29: 5'-ttt gct gta cta gcg aca ccc aca-3'

10

The amplified hBMP2 gene was inserted into a TA cloning vector (Invitrogen, Inc). It was confirmed that the 114 amino acids are contained by comparison with a base sequence (NCBI, NM_001200) in GenBank. The cloned hBMP2 gene was subcloned again into the *Kpn*I sites of a pRSET bacterial expression vector
15 (Invitrogen, Inc), the base sequence of TAT (YGRKKRRQRRR: SEQ ID NO: 27) was inserted in the 5' region of the hBMP2 gene. Then, in front thereof, an Xpress (Invitrogen, Inc) tag, six histidine-encoding base sequences for separation and purification, and initiation base sequence ATG, were inserted, thus constructing a recombinant expression vector for the expression of BMP2 (see FIG. 7). As a
20 negative control, a vector inserted with no TAT was used.

The constructed recombinant vector was introduced into *E. coli* BL21 (Invitrogen Inc.) by a conventional heat shock method, and cultured at 37°C for 2-3 hours. To the culture medium, 1 mM of IPTG (isopropylthio-galactoside) was added, and the
25 resulting culture medium was additionally cultured for 2-18 hours to induce the expression of TAT-BMP2.

The culture broth was centrifuged and then the cell pellet was collected. 8M of a urea solution was added into the cell pellet to remove the two-dimensional and
30 three-dimensional structures of BMP. Ni-Ti beads (Qiagen) were added thereto so

as to bind the TAT-BMP2 to the beads, after which the beads were washed three times with the same solution and eluted using imidazole and high-salt buffer, thus obtaining a purified TAT-BMP2.

- 5 FIG. 8 shows the results of electrophoresis for the total protein before and after inducing protein expression by IPTG during the culture of the transformed *E. coli* BL21. In FIG. 8, the arrow represents the TAT-BMP fusion protein induced by IPTG, lane 1 represents uninduced TAT-BMP2, lane 2 represents TAT-BMP2 induced by IPTG, lane 3 represents uninduced BMP2 (w/o TAT), and lane 4
10 represents BMP2 (w/o TAT) induced by IPTG. As shown in FIG. 8, in the case where the production of the fusion proteins was induced by the addition of IPTG, the TAT-BMP2 fusion protein was produced in a large amount compared to the control group.
- 15 FIG. 9 shows the results of Western blot analysis using an anti-X-press antibody for the purified TAT-BMP2 and BMP2 (w/o TAT). In FIG. 9, lanes 1 and 2 represent TAT-BMP2 and BMP2 (w/o TAT), respectively. As shown in FIG. 9, the addition of TAT (~20kDa) resulted in a slight increase in molecular weight compared to the case of no TAT addition (~18kDa). These results suggest that the TAT-hBMP2
20 fusion polypeptide was successfully prepared.

In order to examine whether the prepared TAT-BMP2 permeates the cell membrane, primarily cultured gingival fibroblasts were treated with the TAT-BMP2 at a concentration of 4 nM for 2 hours, and the cells were collected and Western-blotted
25 with an anti-X-press primary antibody (Invitrogen, Inc). As a result, as shown in FIG. 10, the TAT-BMP2 mostly permeated the cell membrane within 2 hours, and the peptide having no TAT did not permeate the cell membrane. Lane 1 shows the result of Western blot for 4 nM of the TAT-free BMP2 treated for 2 hours, and lanes 2 through 6 show the results of Western blot using an anti-X-press antibody
30 for the intracellular expression of the same concentration of TAT-BMP2 proteins

treated for 0 hr, 15 min, 30 min, 1 hr and 2 hr, respectively. Lane 7 is a Western blot positive control analyzed using 10 ng of TAT-BMP2.

In order to examine whether TAT-BMP2 introduced into cells is refolded to biologically active BMP2 proteins, which then induce the differentiation of bone cells, 2 nM of TAT-BMP2 was administered to the same cells at 48-hr intervals, and after one week, the cells were measured for alkaline phosphatase (ALP) activity. After culturing for 2 weeks, the cells were subjected to von Kossa staining to observe the formation of mineralized substances. As a negative control, TAT-free BMP2 was used, and as a positive control, commercially available rhBMP-2 was used. FIG. 11 shows ALP activities. In FIG. 11, the negative control (N/C) is a result for primarily cultured fibroblasts treated only with a medium for one week, rhBMP-2 is a result for cells treated with commercially available BMP2 at a concentration of 2 nM for one week, TAT-BMP-2 is a result for cells treated with TAT-BMP-2 of this Example at a concentration of 2 nM for one week, and TAT(-)BMP-2 is a result for cells having TAT deleted from TAT-BMP-2. FIG. 12 shows the results of von Kossa staining conducted to observe the deposition of mineralized substances. As shown in FIG. 11 and FIG. 12, the TAT-hBMP-2 of this Example had no biological activity, unlike commercially available rhBMP-2.

Example 2: Preparation of [TAT-FAD-hBMP2] fusion polypeptide (TRP-1)

As described in Example 1, hBMP2 shows biological activity by forming a characteristic internal three-dimensional structure and a dimer by a disulfide bond. However, as described in Example 1, a fusion protein of TAT and hBMP2 had no biological activity to induce bone cell differentiation even though it successfully permeated the cell membrane. This means that proteins having biological activity by secretion are insufficient to show activity only with the restructuring of amino

acids by, e.g., HSPs, unlike the prior PTD-fused proteins (*Trends Cell Biol.*, 10:290, 2000; *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 4:97, 2003).

BMPs and TGF- β are present in a form of precursor consisting of more than 400
5 amino acids, when biosynthesized in intracellular ribosomes. The synthesized
amino acids transport to Golgi complexes, endosomes, etc., by signal peptides
present in the N-terminal region, and cleaved and activated by proprotein
convertase, such as furin, and then secreted extracellularly (*Nature Rev. Mol. Cell
Biol.*, 3:753, 2002; *J. Cell Biol.*, 144:139, 1999). The proteins are subjected to
10 post-translational modification in the golgi complexes, etc., in which a signal
peptide and prodomain located at the amino N-terminal region play a critical role
(*Mol. Biol. Cell*, 15:5012, 2004). In this process, the BMP precursor is activated
into a mature BMP moiety by the cleavage of the furin cleavage site (-RSKR-) with
furin and then secreted, similarly to other secretory proteins (Constam, D.B. &
15 Robertson, E.J., *J. Cell Biol.*, 144:139, 1999; Cui, Y. *et al.*, *Genes & Development*,
15:2797, 2001). However, in said article, there is neither mention of a method for
the intracellular administration of the BMP precursor, nor suggestion that the BMP
precursor is introduced into cells in the form of a fusion with, particularly PTD.

20 Those known proprotein convertases, such as furin, include PC7, PC5/6A, PC5/6B,
PACE4, PC1/3, PC2, and PC4 (*Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002). They
are abundantly found in most of intracellular organelles, particularly Golgi networks,
endosomes, and secretory granules, and play important roles not only in the
activation of various proteins, but also in the activation of infectious diseases.
25 Human mature proteins, which are activated by proprotein convertase, such as furin,
include, in addition to BMPs/TGF- β , a group of TNF- α proteins, such as β -NGF
(β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase-
like) and ectodysplasin-A(Eda-1), a group of MMPs, including MT1-MMP
(membrane type-matrix metalloproteinase) and MMP-2, and IGF-1 (*Nature Rev.*
30 *Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002).

It is particularly known that, when BMPs are naturally biosynthesized in cells, one or two furin cleavage sites in the prodomain of the BMP precursor contribute to the activation of BMPs (*J. Cell Biol.*, 144:139, 1999; *Genes Dev.*, 15:2797, 2001). In the case of human BMP2, one or two furin cleavage sites (RXKR, wherein R: Arg, K: Lys, X: other amino acids except for basic amino acids) are present in the prodomain and were deduced to play an important role in the activation and secretion of the PTD-BMP2 fusion protein. To prove this hypothesis, in this Example, a polypeptide having a structure of TAT-FAD-hBMP2 was prepared by adding a furin cleavage site-containing FAD having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 to the TAT-hBMP2 of Example 1.

For this purpose, to add the FAD-encoding base sequence, DNA having both a base sequence encoding hBMP2 of SEQ ID NO: 1 and a base sequence encoding FAD having an amino acid sequence of SEQ ID NO: 14 was amplified in the same manner as in Example 1 using primers of SEQ ID NOs: 30 and 31. The base sequence of the amplified DNA was confirmed and then, the gene was cloned into a bacterial expression vector in the same manner as in Example 1.

SEQ ID NO: 30: 5'-gag ttt ttc cat gtg gac gct ctt-3'
SEQ ID NO: 31: 5'-ttt gct gta cta gcg aca ccc aca-3'

The transformed *E. coli* was cultured and purified in the same manner as in Example 1, thus obtaining TAT-FAD-hBMP2 (TRP-1). Namely, the culture broth having TRP-1 produced in *E. coli* was centrifuged, and to the supernatant and cell pellet, 8M of urea solution was added to remove the two-dimensional and three-dimensional structures of BMP2. To the remaining substance, Ni-Ti beads (Qiagen) were added so as to bind TRP-1 to the beads, and the beads were washed three times with the same solution and eluted using imidazole and high-salt buffer, thus obtaining a purified TRP-1 (see FIG. 3).

Meanwhile, to confirm the importance of the signal peptide, the prodomain and the furin cleavage site, the constructed expression vector as a template and each of primers of SEQ ID NOs: 32 and 33 (Δ Sig), SEQ ID NOs: 34 and 35 (Δ Pro), and SEQ ID NOs: 36 and 37 (R283A), were used to construct the respective deletion or
 5 mutation vectors. A schematic diagram of these vectors is shown in FIG. 13.

SEQ ID NO: 32: 5'-tcc acc atg gcc ggt acc ctc gtt ccg gag ctg ggc-3'

SEQ ID NO: 33: 5'-gcc cag ctc cgg aac gag ggt acc ggc cat ggt gga-3'

SEQ ID NO: 34: 5'-tcc acc atg gcc ggt acc gat gga aaa ggg cat cct-3'

SEQ ID NO: 35: 5'-agg atg ccc ttt tcc atc ggt acc ggc cat ggt gga-3'

10 SEQ ID NO: 36: 5'-ctc cac aaa aga gaa aaa gct caa gcc aaa cac aaa cag-3'

SEQ ID NO: 37: 5'-ctg ttt gtg ttt ggc ttg agc ttt ttc tct ttt gtg gag-3'

E. coli was transformed with each of the constructed expression vectors and then cultured and purified in the same manner as described for TRP-1, thus obtaining
 15 several TRP-1 variants. In FIG. 13, TRP-1 represents TAT-FAD-hBMP2 according to this Example, which comprises FAD added to TAT-hBMP2; Δ (Sig), was obtained by deleting a signal peptide portion (amino acid residues 1-24 of SEQ ID NO: 14) from TAT-FAD-hBMP2; Δ (FAD) was obtained by deleting an N-terminal FAD (amino acid residues 1-269 of SEQ ID NO: 14) from TAT-FAD-
 20 hBMP2 such that the Δ (FAD) had only TAT-hBMP2 and a second furin cleavage site; and R283A was obtained by mutating the Arg of the second furin cleavage site of TAT-FAD-hBMP2 to Ala. The N-terminal region of each of the expression vectors contained a TAT domain, a X-press tag, etc., as in the case of Example 1, and after construction, the base sequence of each of the vectors was analyzed.

25

Next, each of the above-prepared TRP-1 and its variants was introduced into the same kind of cells. Namely, primarily cultured fibroblasts were treated with each of the recombinant proteins at a concentration of 2 nM for 2 hours, and the cells were collected and Western-blotted with an anti-X-press antibody (FIG. 14). As a

result, as shown in FIG. 14, TRP-1 and its variants were all permeated into the cells and detected.

Example 3: Cleavage and activation of TRP-1 by proprotein convertase

5

In order to examine whether the inventive non-activated TRP-1 is cleaved and activated by furin in cells, TRP-1 prepared in Example 2 was cleaved *in vitro* using a recombinant furin protein (Sigma, USA). As a result, as shown in FIG. 15, TRP-1 was successfully cleaved *in vitro* by the furin.

10

Also, in order to examine whether the inventive non-activated TRP-1 is activated by furin in cells, intracellular furin was inhibited using $\alpha 1$ antitrypsin Portland ($\alpha 1$ -PDX) expression vector (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:7293, 1998), as a furin inhibitory protein. Because the inventive non-activated TRP-1 is converted to a
15 biochemically active protein after introduction into cells, the amount of TRP-1 initially introduced into cells shall gradually decrease at a given time after the administration of TRP-1. Thus, it can be expected that, when furin is inhibited by inducing the expression of $\alpha 1$ -PDX, the remaining amount of TRP shall increase.

20 As a result, as shown in FIG. 16, the half-life of the inventive TRP-1 was increased by the expression of $\alpha 1$ -PDX (i.e., the inhibition of furin enzyme). Namely, when administered with the inventive TRP-1, the group administered with $\alpha 1$ -PDX showed an increase in half life compared to the control group after 4 hours (asterisked). This result suggests that TRP-1 administered into cells is cleaved and
25 activated by furin enzyme.

Example 4: Importance of FAD in activation of TRP-1

It was confirmed through Examples 2 and 3 that TRP-1 is cleaved and activated by
30 furin in cells. Thus, it can be expected that FAD and the furin cleavage site will

play an important role in making the TRP-1 to show biological activity after administration into cells.

To confirm this expectation, TRP-1 obtained in Example 2 and its variants were added to primarily cultured fibroblasts and observed for ALP activity and the deposition of mineralized substances (FIG. 17). TRP-1 and its variants were measured for alkaline phosphatase (ALP) activity in the same manner as in Example 1, as a result, as shown in FIG. 17, TRP-1 (TAT-FAD-hBMP2) showed high ALP activity, and the TRP-1 variant [Δ (Sig)] from which a signal peptide has been deleted showed a similar or higher activity than that of TRP-1. These results indicate that the signal peptide is not necessary for the activation of BMP2 by TAT and FAD. However, it can be seen that the variant [Δ (FAD)] containing only a second furin activation site in TAT-hBMP2, and the variant (R283A) having a mutation in a portion of the furin cleavage site of TRP-1, had no biological activity.

Also, each of TRP-1 and its variants were treated for 2 weeks according to the above-described method and stained by the von Kossa method and then observed for the formation of mineralized substances. As a result, as shown in FIG. 18, the mineralization inducing effects were similar to ALP activity. Herein, commercially available rhBMP-2 treated at the same concentration was used as a positive control, and an untreated medium was used as a negative control (N/C). These results suggest that, in order for the TAT-FAD-hBMP2 recombinant protein to permeate into cells and to have biological activity, a process for migration from ribosomes to golgi networks is unnecessary unlike the case of naturally biosynthesized hBMP-2 or rhBMP-2, but the furin cleavage site must be present in a complete and precise manner.

The results of this Example indicate that, when the inventive TAT-FAD-hBMP2 fusion polypeptide has a deletion of any one domain in a polypeptide consisting of 3 domains of PTD, FAD and TRD (hBMP2 in this Example) or has a defect, it cannot

exhibit the desired pharmacological effects upon administration into the human body. Although this interpretation of mechanisms for the pharmacological action of TRP-1 (FIG. 6) cannot be complete, it is expected that, when polypeptides, such as non-activated BMPs or TGF- β proteins, are administered into the human body for the purpose for regenerating bones, cartilages or other various tissues, the inventive TRP-1 shall show highly useful pharmacological effects and remarkably high commercial values, compared to previously known products. Namely, the TAT-FAD-hBMP-2 was designed under the concept of new pharmacological actions completely different from previously known BMPs or TGF- β proteins and prepared according to a new method, and was thus named "TRP-1".

Example 5: Preparation of TRP-2[TAT-FAD-BMP7]

As described in Example 4, when secretory proteins, such as BMPs and TGF- β , are fused with PTD, it is insufficient to only make them to have full length, and upon biosynthesis *in vivo*, they must sufficiently have furin cleavage and activation sites in a precursor formed. Human BMP7 is known to stimulate the differentiation of bones and cartilages, and recently known to act as an antagoist of TGF- β which is a member of the same gene group, thus inhibiting the fibrosis and cirrhosis of kindenys, liver, lungs and heart (*Nature Med.*, 9:964, 2003; *J. Clin. Invest.*, 112:1776, 2003).

In this Example, a base sequence encoding an amino acid sequence comprising FAD of SEQ ID NO: 19 and hBMP7 of SEQ ID NO: 6 was amplified in the same manner as in Example 2 using primers of SEQ ID Nos: 38 and 39. The amplified base sequence was analyzed in GenBank (NCBI, NM_001719), and cloned into a bacterial expression vector in the same manner as in Example 2 so as to prepare a recombinant polypeptide that was then named "TRP-2".

SEQ ID NO: 38: 5'-ggc gcg atg cac gtg cgc tc ctg -3'

SEQ ID NO: 39: 5'-agg gtc tga att ctc gga gga gct -3'

FIG. 19 shows the results of electrophoresis for a total protein before and after inducing the expression of the protein by IPTG in the culture of transformed *E. coli* BL21. In FIG. 19, the arrow represents a TRP fusion protein induced by IPTG; lane 1 represents uninduced TRP-1; lane 2 represents TRP-1 induced by IPTG; lane 3 represents uninduced TRP-1 (w/o TAT); lane 4 represents TRP-1 (w/o TAT) induced by IPTG; lane 5 represents uninduced TRP-2 (w/o TAT); lane 6 represents induced TRP-2 (w/o TAT); lane 7 represents uninduced TRP-2; and lane 8 represents TRP-2 induced by IPTG. As shown in FIG 19, in the case where the production of fusion proteins by the addition of IPTG was induced, TRPs were induced in larger amounts than that in the control group.

FIG. 20 shows the results of Western blot analysis using an anti-X-press antibody for the purified TRPs. In FIG. 20, lanes 1 through 4 represent TRP-1, TRP-1 (w/o TAT), TRP-2 (w/o TAT) and TRP-2, respectively. As shown in FIG. 20, the addition of TAT showed a slight increase in molecular weight compared to the case of no addition, suggesting that the TRP fusion polypeptides were successfully prepared.

20 **Example 6: Intracellular transduction of TRP-1 and TRP-2**

In this Example, primarily cultured gingival fibroblasts were first treated with 4 nM of each of TRP-1 and TRP-2 purified in Examples 2 and 5, and the TRP-1 and TRP-2 present in each of the cells and media were examined for intracellular transduction by comparing their expression levels.

As a result, as shown in FIG. 21, TRP-1 permeated the cell membrane and transduced into cells. Namely, the primarily cultured gingival fibroblasts were first treated with 4 nM of TRP-1, and the expression of TRP-1 present in each of the cell and medium was analyzed by Western blot. As a result, The TRP-1 proteins

mostly transduced into the cells within one hour and little remained in the medium after 6 hours. However, the control group having no TAT did not enter the cells at all. Also, TRP-2 was administered into the cells in the same manner. As a result, as shown in FIG. 22, TRP-2 also permeated the cell membrane and transduced into the cells within 2 hours, but the control group having no TAT did not enter the cells at all.

Example 7: Secretion of activated BMP by TRPs and importance of PTD

10 In this Example, in order to examine whether the activated BMP is secreted in cells introduced with TRPs, TRP-1 was introduced into the cells and measured for the secretion of the activated BMP2 within 48 hours. As a result, as shown in FIG. 23, the TRP-1 introduced into the cells secreted the activated BMP2 within 48 hours. Herein, rhBMP-2, which is a commercially available active BMP2, was used as a
15 positive control.

Also, the inventive TRP-1 was introduced into the primarily cultured fibroblasts and analyzed for the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances, thus examining effects on the differentiation of bone cells and the
20 regeneration of bones. For this purpose, fibroblasts were cultured for one week, being treated with each of 2 nM of rhBMP-2 and TRP-1 for 2 weeks. After one week, the cells were subjected to von Kossa staining and observed visually, as a result, as shown in FIG. 24, the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances could not be observed in the case of a negative control
25 (N/C) consisting of only the cell culture medium, and TRP-1 having no TAT (i.e., [TRP-1(TAT-)]). However, in the case of TRP-1 and commercially available rhBMP-2, the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances could be observed in the fibroblasts.

In addition, fibroblasts were treated in the same manner for one week and measured for alkaline phosphatase (ALP) activity used as a bone cell differentiation marker. As a result, as shown in FIG. 25, the inventive TRP-1 and the commercially available rhBMP-2 showed similar ALP induction effects.

5

Meanwhile, in order to compare the potency of the commercially available BMP2 (rhBMP-2) with that of the inventive TRP-1, fibroblasts were cultured for one week, treated with each of TRP-1 and rhBMP-2 and subjected to von Kossa staining, followed by visual observation. As a result, as shown in FIG. 26, the inventive TRP-1 and the activated rhBMP-2 showed similar potencies. Specifically, at concentrations of higher than 0.5 nM, the commercially available rhBMP-2 and the inventive TRP-1 showed similar potencies.

10

Example 8: Activation half life of TRPs after cell membrane permeation

15

In this Example, in order to confirm that TRPs introduced into cells are secreted in the form of activated BMPs after processes for protein rearrangement by HSPs, etc., and activation by furin, the activation half life of the administered proteins was examined. For this purpose, the 293 cell line (ATCC CRL-1573) having high furin activity was administered with the inventive TRP-1 and treated in the same manner as in Example 6. Then, the expression of the TRP-1 in the cells was analyzed hourly by Western blot.

20

As a result, as shown in FIG. 27, the TRP-1 administered into the cells had a half-life of 3-4 hours in the 293 cells. The half-life varied depending on the type of cells, in which the half-life was about 6 hours in the osteogenic sarcoma cell line, and about 8 hours in the primarily cultured fibroblasts. These results suggest that the inventive TRPs are secreted in the form of activated BMPs after activation by HSPs, furin, etc., in cells.

25

30

Example 9: Cell membrane permeation of TRPs and effect of temperature on permeation

The commercially available recombinant rhBMPs pass through receptors present in the cell membrane, but the inventive TRPs directly permeate the cell membrane, and the intracellular permeation of the prior rhBMP-2 through the receptor is dependent on temperature. In order to examine whether the intracellular permeation of the inventive TRPs is dependent on temperature, the inventive TRP-1 and TRP-2 were administered at varying temperatures, and observed with confocal fluorescent microscope at various points in time. Herein, each of the inventive TRP-1 and TRP-2 was used at a constant concentration of 10 nM and treated at various temperatures and time points as shown in FIG. 28. The permeated TRPs were allowed to react with anti-X-press (Invitrogen) as a primary antibody and Alexa-Fluoro-488 (Invitrogen) as a secondary antibody, and their nuclei were stained with Far-Red TOTO-3 (Molecular Probes). The uppermost photographs in FIG. 28 show that TRP-1 entered the cytoplasm at 37°C, and the photograph indicated by "Merge" shows the merged image of the cell nuclei with TRP-1 having the same cross section. Also, the middle photographs show the merged images of TRP-1 treated for 5 min and TRP-2 treated for 5 and 60 min. The lowest photographs show the merged images of TRP-1 and TRP-2 that have been treated at 4°C for 60 min and transduced into cells.

As a result, as shown in FIG. 28, TRP-1 permeated the cell membrane within 5 minutes after administration at 37°C. After about one hour, TRP-1 and TRP-2 were mostly found in the cytoplasm although they were also partially present in the nuclei. In addition, they also showed permeation patterns at 25°C and 4°C in a manner similar to the case of 37°C. These results revealed that the cell membrane permeation of the inventive TRPs is independent on temperature.

Example 10: Specific binding between TRPs introduced into cells and F-actin

As described above, the inventive TRPs were present in cells in the form of a linear pattern. In this Example, in order to examine whether the inventive TRPs are present specifically in a specific organelle or structure after cell membrane permeation, the TRPs were subjected to immunofluorescent staining using phalloidin specific to a F-actin stress fiber having an arrangement similar to their structure (*Science*, 276:1425, 1997) and observed with a confocal fluorescent microscope (FIG. 29). In this case, TRP-1 and TRP-2 were fluorescence-stained in the same manner as in Example 9, and Phalloidin-Alexa-594 (Molecular Probes) was used for F-actin-specific staining. In FIG. 29, weak blue images in the Merge photographs show the lower portions of cell nuclei.

As a result, as shown in FIG. 29, the inventive TRP-1 and TRP-2, after administration, not only have the same arrangement as that of cellular F-actin, but also are present in the same location as that of F-actin. This indicates that TRPs specifically react and bind with F-actin after permeation into cells. These results revealed that TRPs are not randomly distributed in the cells, but are rather bound specifically to F-actin and are converted to active BMPs through various processes for activation and furin cleavage, when permeated into cells.

Example 11: Induction of bone formation by TRPs in animal test models

Examples 1 through 10 revealed that the inventive TRP-1 and TRP-2 permeate the cell membrane and are activated by furin, and the activated proteins induce the differentiation of bone cells and the formation of mineralized substances. In this Example, in order to examine whether the inventive TRPs induce bone formation *in vivo*, a naturally incurable defect (8 mm critical defect) was made in the skull of each of rats. Then, the inventive TRP-1 and the commercially available rhBMP-2 were administered into the defects and observed for the induction of bone formation (FIG. 30). In making the naturally incurable damage in the skull of each rat, 8-

mm-diameter trephine was used to the defect. In a negative control, type I collagen was used, and in a positive control (rhBMP), a mixture of commercially available recombinant BMP2 and type I collagen was used. The inventive TRP-1 was administered in the same manner as the positive control. Also, each of
5 rhBMP-2 and TRP-1 was administered in an amount of 10 nmole. Two weeks after the administration of BMPs, the tissue of each test group was taken and fixed in 10% formalin for 24 hours, and 4- μ m sections of the tissue were stained with hematoxylin/eosin and then observed with an optical microscope. In FIG. 30, both the arrows indicate the ends of each bone defect, and the lowest box is an enlarged
10 view of a bone formation site induced by TRP-1.

As a result, as shown in FIG. 30, the differentiation of bone cells and the formation of bones were actively induced in vivo only 2 weeks after administration with the inventive TRP-1. Also, the administration of TRP-1 showed potency better or at
15 least similar to the commercially available rhBMP-2 administered at the same amount.

Example 12: Cytotoxicity of TRPs

20 Examples 1 through 11 presented the mechanisms and potential effects of the inventive TRPs, which result from their administration to cells or tissues. In order to examine cytotoxicity occurring when the inventive TRPs were administered in excess, the inventive TRPs together with the commercially available rhBMP were analyzed for cytotoxicity while increasing their concentration to 200 nM. For this
25 purpose, TRP-1 and recombinant BMP2 were administered to primarily cultured fibroblasts at various concentrations, and 72 hours after the administration, the number of viable cells was counted (FIG. 31). As a result, as shown in FIG. 31, TRP-1 did not showed any cytotoxicity even when it was administered at a concentration of 200 nM.

Although specific embodiment of the present invention was described in detail above, those skilled in the art would appreciate that these descriptions are only intended to give preferred embodiments and are not construed to limit the scope of the present invention. For example, the administration of the inventive TRP-1 to
5 the human body will be useful to stimulate the formation of bones and cartilages, while the administration of the inventive TRP-2 to the human body will be useful not only to stimulate the formation of bones or cartilages, but also to improve the fibrosis and cirrhosis of kidneys, liver, lungs and heart depending on circumstances and administration conditions. Accordingly, the substantial scope of the present
10 invention will be defined by the appended claims and equivalents thereof.

INDUSTRIAL APPLICABILITY

15 As described in detail above, the present invention provides the non-activated polypeptides having pharmacological mechanisms completely different from those of the prior active proteins. The inventive TRPs have new mechanisms where they are in a non-activated state before *in vivo* administration but are activated *in vivo*. Thus, the inventive TRPs do not require additional equipment or cost for
20 maintaining a three-dimensional structure to bind to the cell membrane receptor. In addition, the inventive TRPs are simple to produce, very easy to separate and purify, low in production cost, and also convenient to store, handle and administer. Accordingly, these TRPs can substitute for the prior activated proteins, such as rhBMPs.

25

THE CLAIMS

What is claimed is:

- 5 1. A non-activated tissue-regeneration polypeptide (TRP) containing:
- (a) a protein transduction domain (PTD) making the polypeptides to permeate cell membranes without cell membrane receptors;
 - (b) a furin activation domain (FAD) which has at least one proprotein convertase cleavage site and is cleaved by the proprotein convertase to activate
 - 10 tissue regeneration domain (TRD) in cells; and
 - (c) a non-activated TRD which is activated by the proprotein convertase cleavage of the FAD, and which stimulate the growth or formation of tissues or to induce the regeneration of tissues.
- 15 2. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the proprotein convertase is furin.
3. The non-activated TRP according to claim 1, which has no three-dimensional stereoregularity and has no biological activity itself.
- 20 4. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the proprotein convertase cleavage site of the FAD is cleaved by proprotein convertase present in living cells, whereby the TRD is activated, and the activated TRD is secreted extracellularly.
- 25 5. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the TRD to be cleaved by proprotein convertase is selected from the group consisting of BMPs, TGF- β , β -NGF (β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintergrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs (matrix metalloproteinases), and insulin-like growth factor (IGF-1).

6. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the TRD is an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 13.

7. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the FAD is an amino acid
5 sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14 to 26.

8. The non-activated TRP according to claim 1, wherein the PTD is selected from the group consisting of TAT, drosophila melanogaster-derived Antp peptide, VP22 peptide and mph-1-btm.

10

9. The non-activated TRP according to claim 1, which is in the form of fusion polypeptide of PTD, FAD and TRD.

10. A recombinant vector inserted with an FAD-encoding base sequence in front of
15 the 5' region of TRD-encoding DNA, a PTD base sequence, a base sequence for tagging, and at least four histidine-encoding base sequences for separation and purification

11. A transformed bacteria with the recombinant vector of claim 10.

20

12. A method for preparing non-activated TRP, comprising the steps of:

(a) culturing the transformed bacteria of claim 11 to express a [PTD-FAD-TRD] polypeptide; and

(b) centrifuging the culture broth, and then removing the two-dimensional or
25 three-dimensional structure of the polypeptide or converting the two-dimensional or three-dimensional structure to one-dimensional linear structure by addition of urea solution into the supernatant and cell pellet, and then purifying the [PTD-FAD-TRD] polypeptide.

30 13. The method for preparing non-activated TRP according to claim 12, wherein the

TRD to be cleaved by proprotein convertase is selected from the group consisting of BMPs, TGF- β , β -NGF (β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs (matrix metalloproteinases), and insulin-like growth factor (IGF-1).

5

14. The method for preparing non-activated TRP according to claim 12, wherein the TRD is an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 1 to 13.

10 15. The method for preparing non-activated TRP according to claim 12, wherein the FAD is an amino acid sequence selected from the group consisting of SEQ ID NOs: 14 to 26.

15 16. The method for preparing non-activated TRP according to claim 12, wherein the PTD is selected from the group consisting of TAT, drosophila melanogaster-derived Antp peptide, VP22 peptide and mph-1-btm.

17. The method for preparing non-activated TRP according to claim 12, wherein the purification step comprises the sub-steps of binding the polypeptide to nickel-
20 titanium beads, washing the beads with the same solution, and then eluting the beads with imidazole and a high-salt buffer solution.

18. A composition for stimulating the formation or regeneration of tissue, containing the non-activated TRP of any one claim among claims 1~9, as an active
25 ingredient.

19. The composition according to claim 18, wherein the tissue is bone or cartilage.

20. The composition according to claim 19, which further contains the growth

factor selected from the group consisting of TGF- β , IGF, PDGF, and FGF.

21. A composition for improving the fibrosis or cirrhosis of organs, containing the non-activated TRP of any one claim among claims 1~9, as an active ingredient.

5

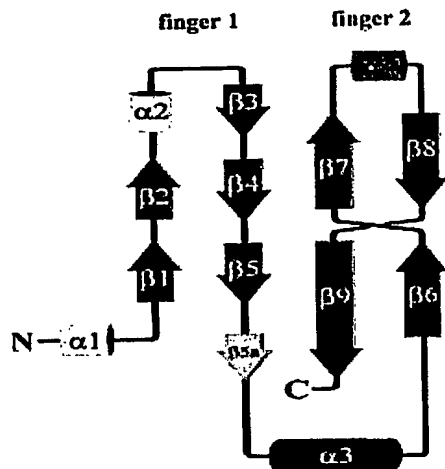
22. The composition according to claim 21, which further contains the growth factor selected from the group consisting of TGF- β , IGF, PDGF, and FGF.

FIGURES

1/14

FIG. 1

a.



b.

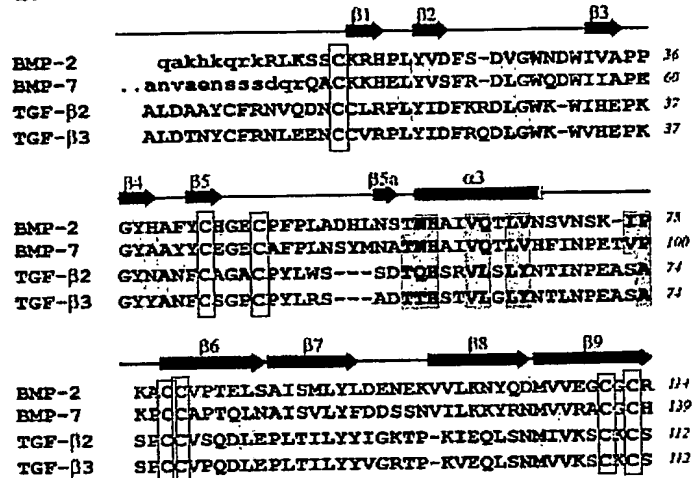
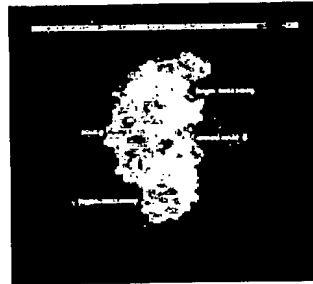


FIG. 2



2/14
FIG. 3

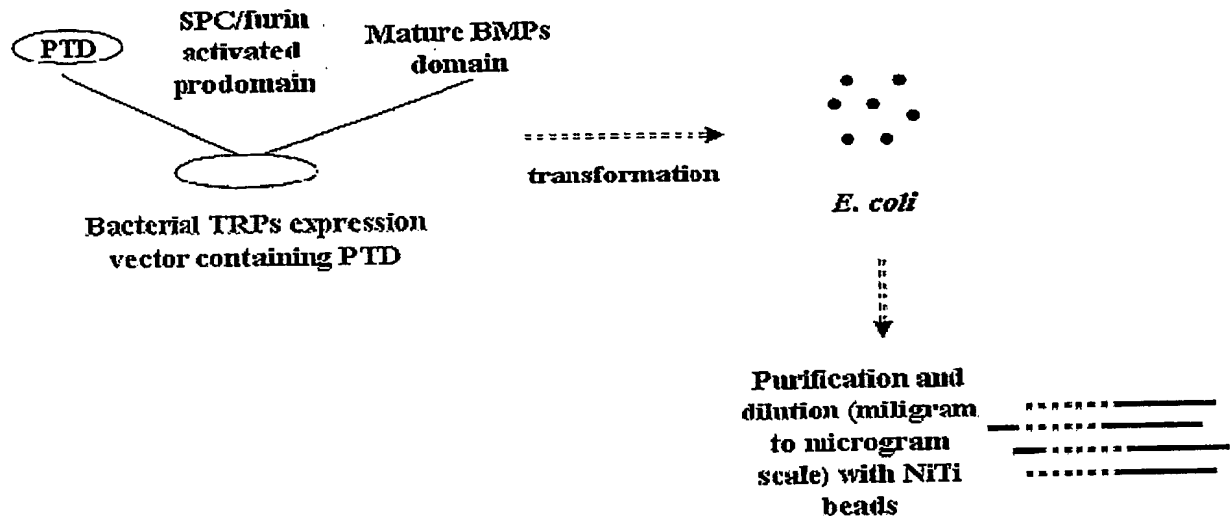
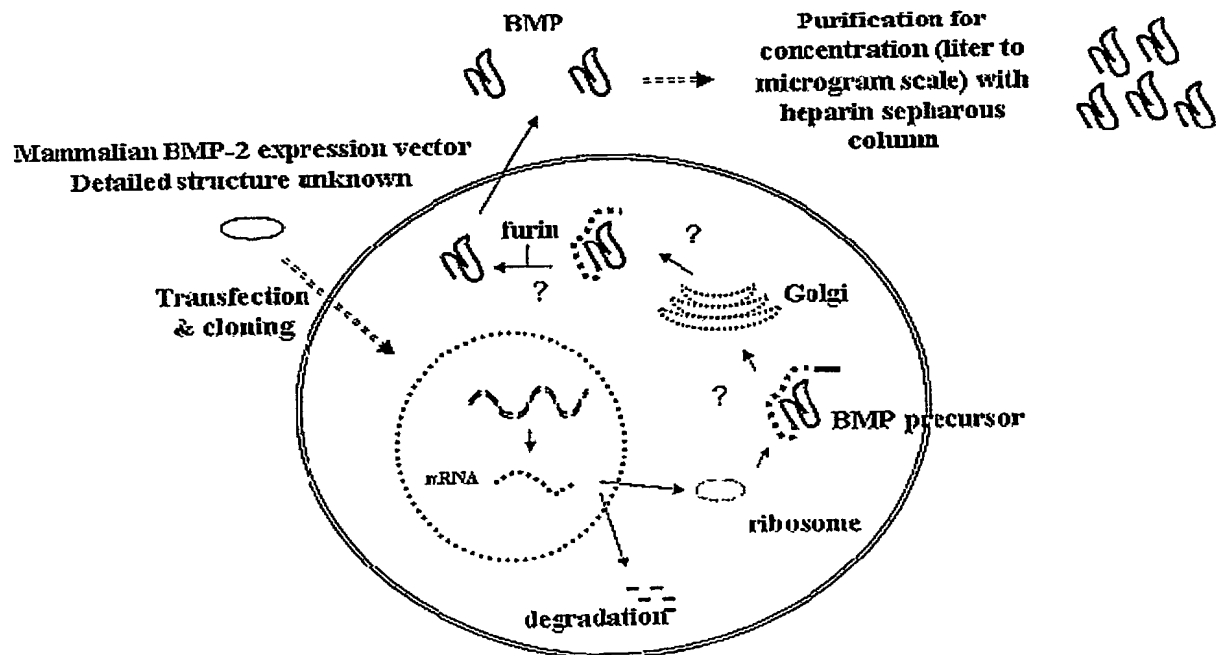


FIG. 4



3/14
FIG. 5

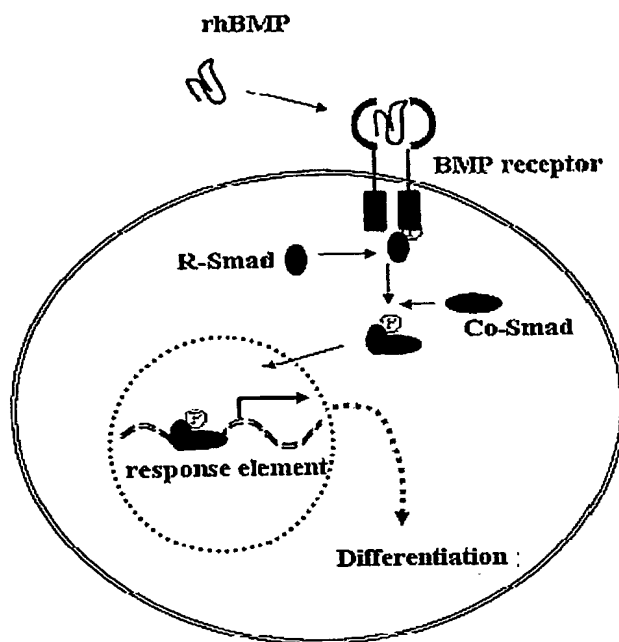
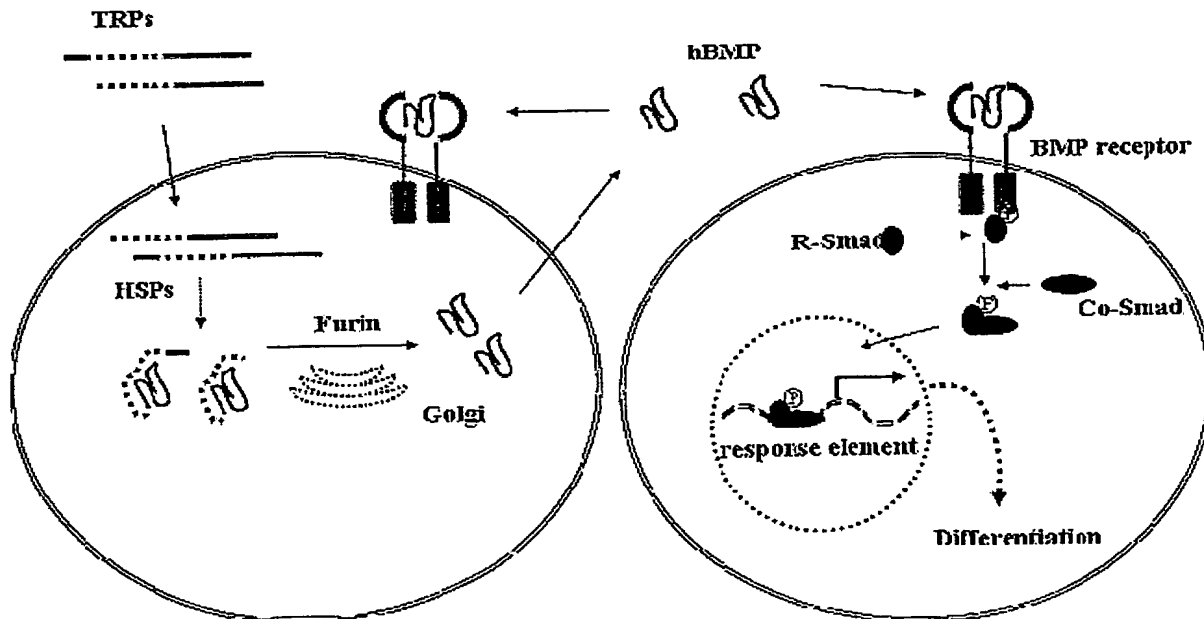


FIG. 6



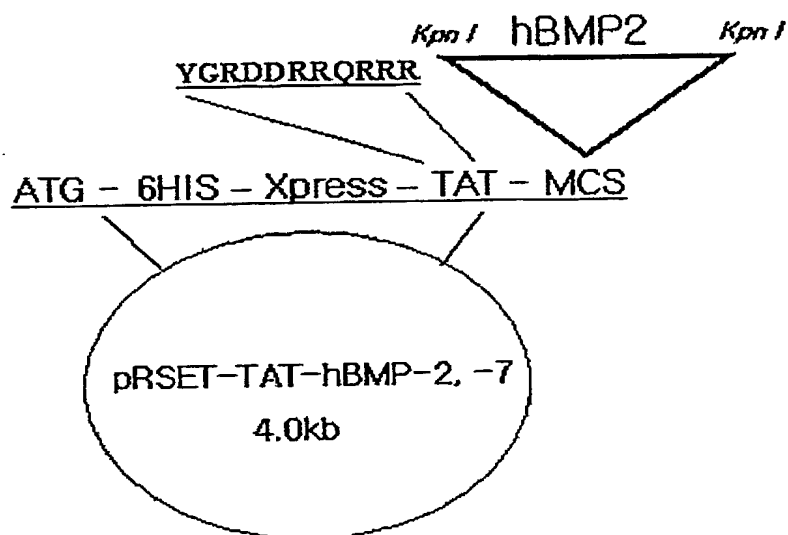
4/14
FIG. 7

FIG. 8

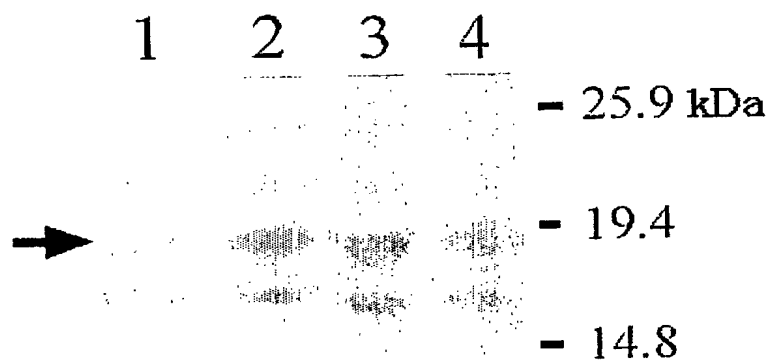
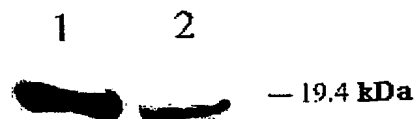


FIG. 9



5/14
FIG. 10

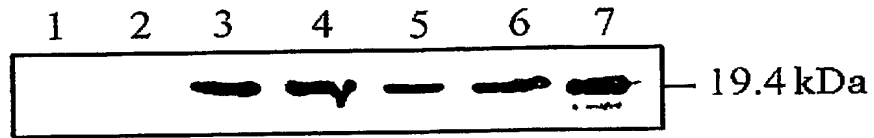


FIG. 11

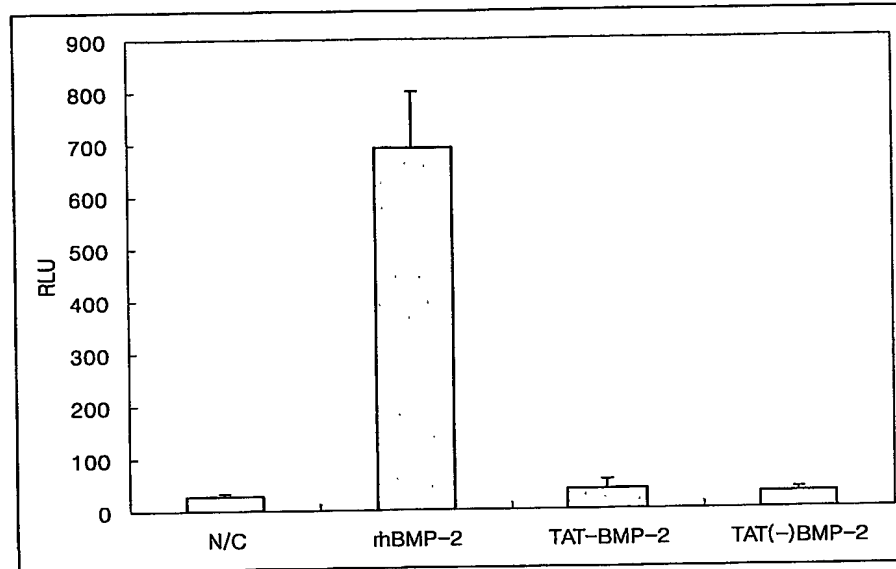
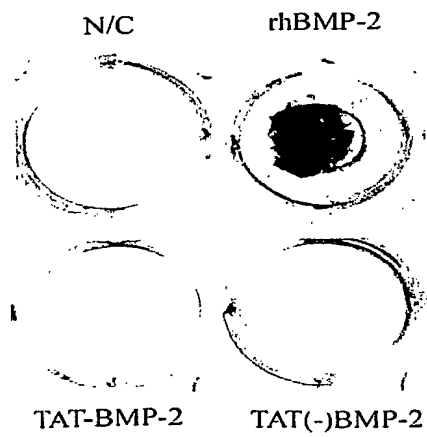


FIG. 12



6/14
FIG. 13

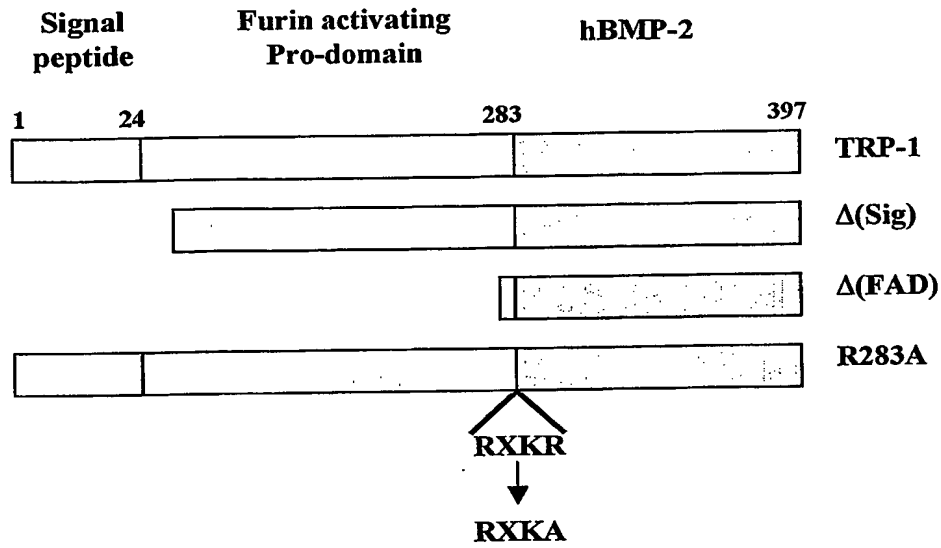
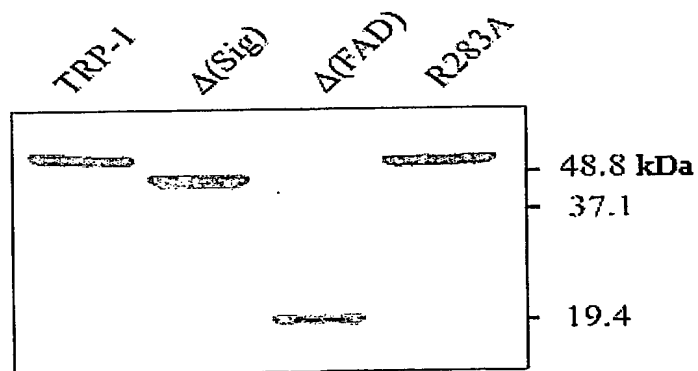


FIG. 14



7/14
FIG. 15

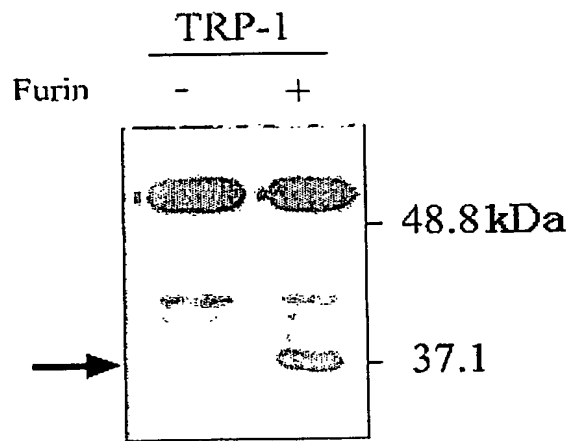
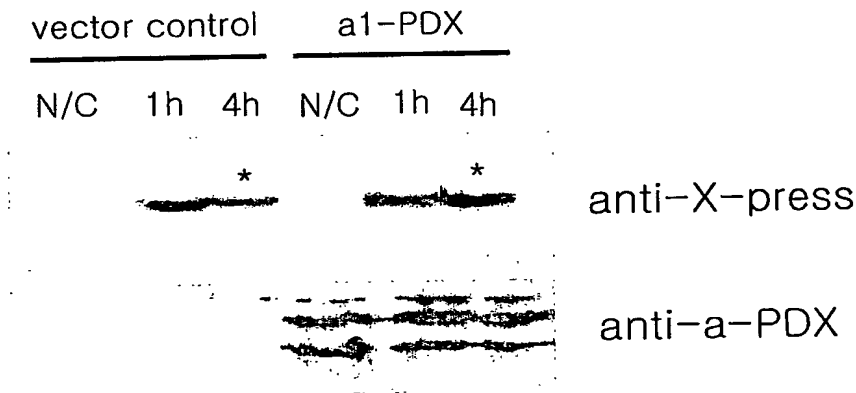


FIG. 16



8/14
FIG. 17

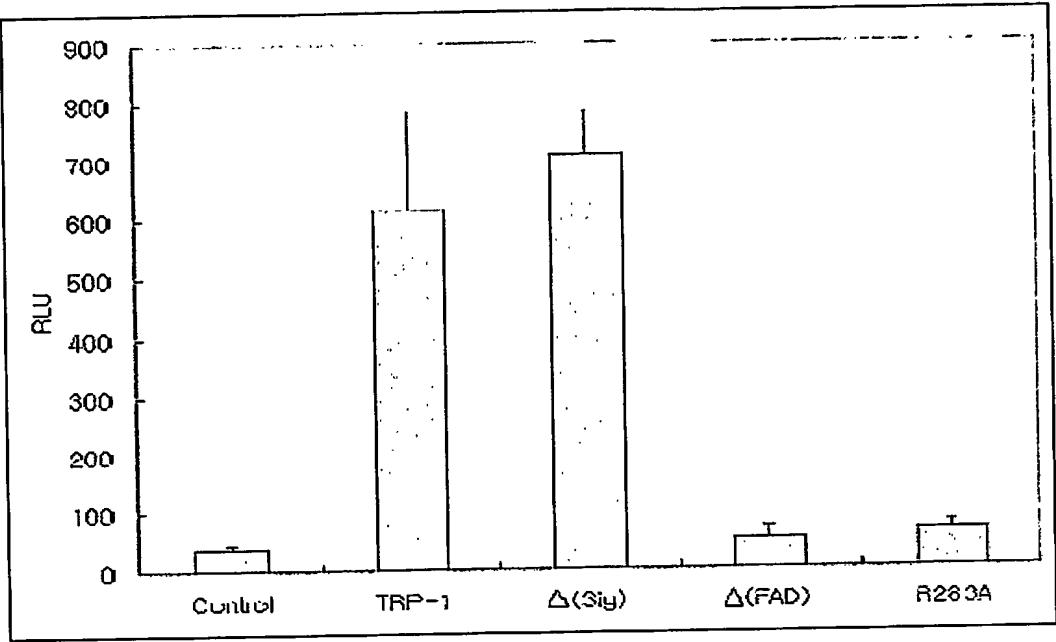
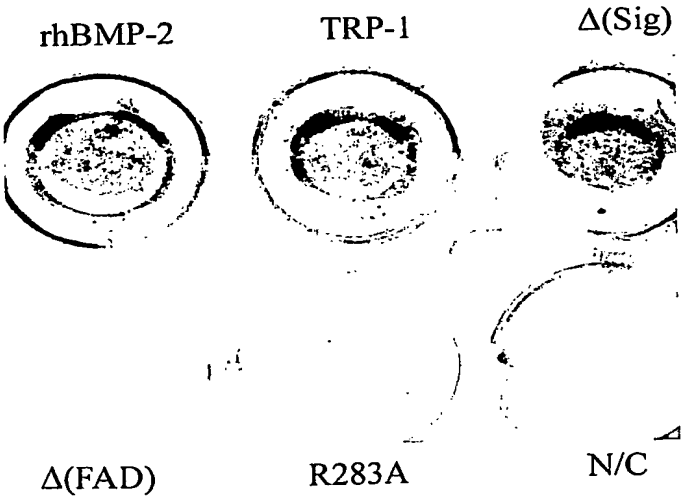


FIG. 18



9/14
FIG. 19

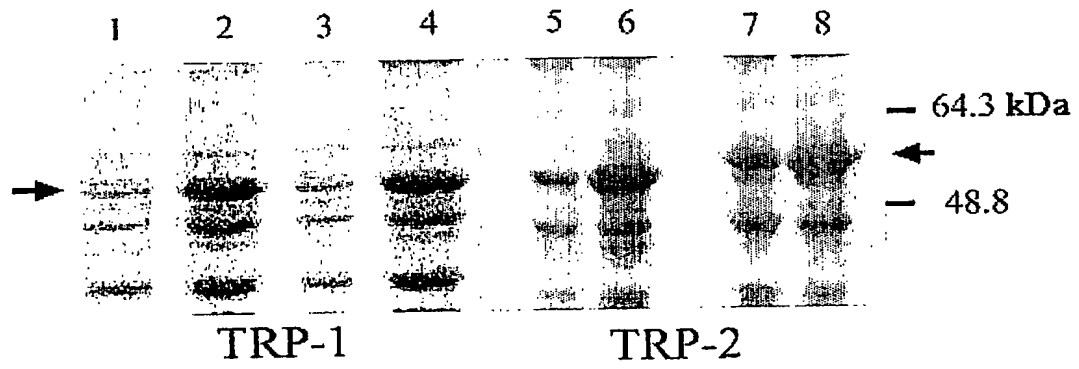
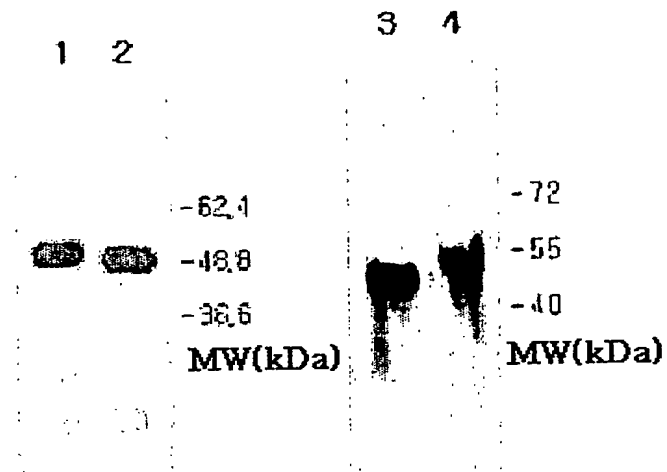


FIG. 20



10/14
FIG. 21

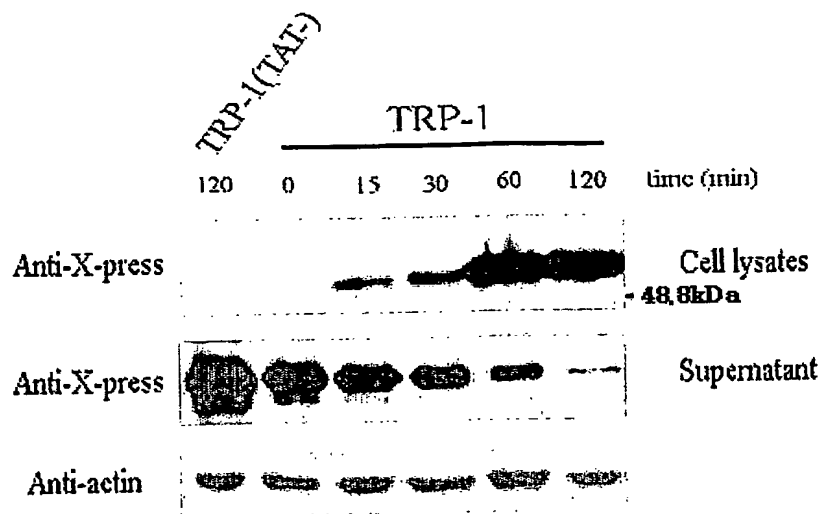


FIG. 22

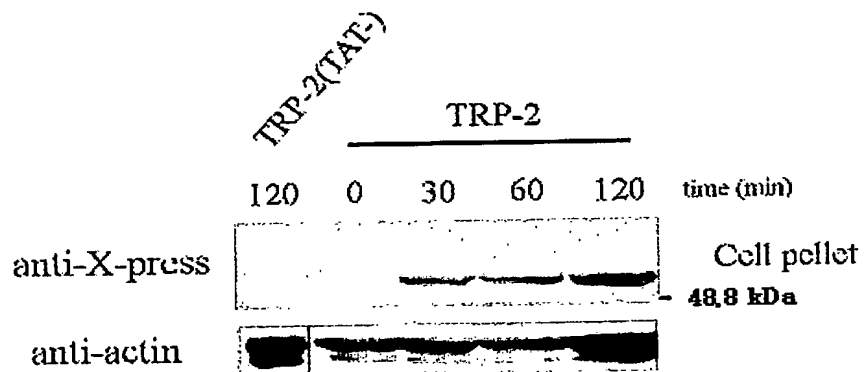
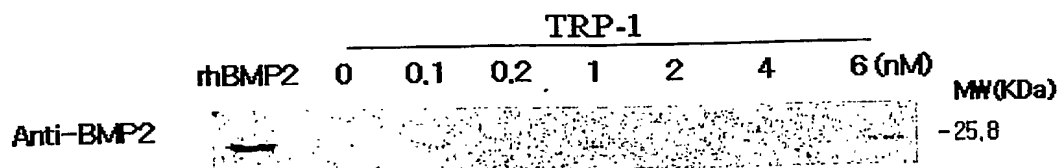


FIG. 23



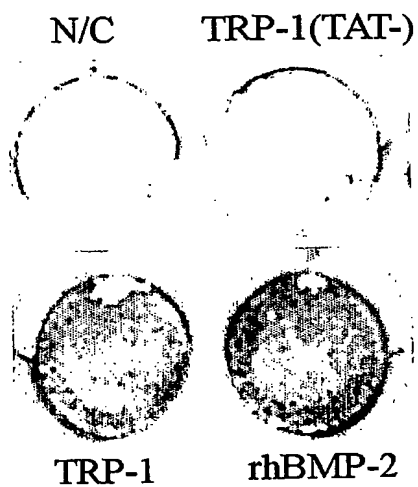
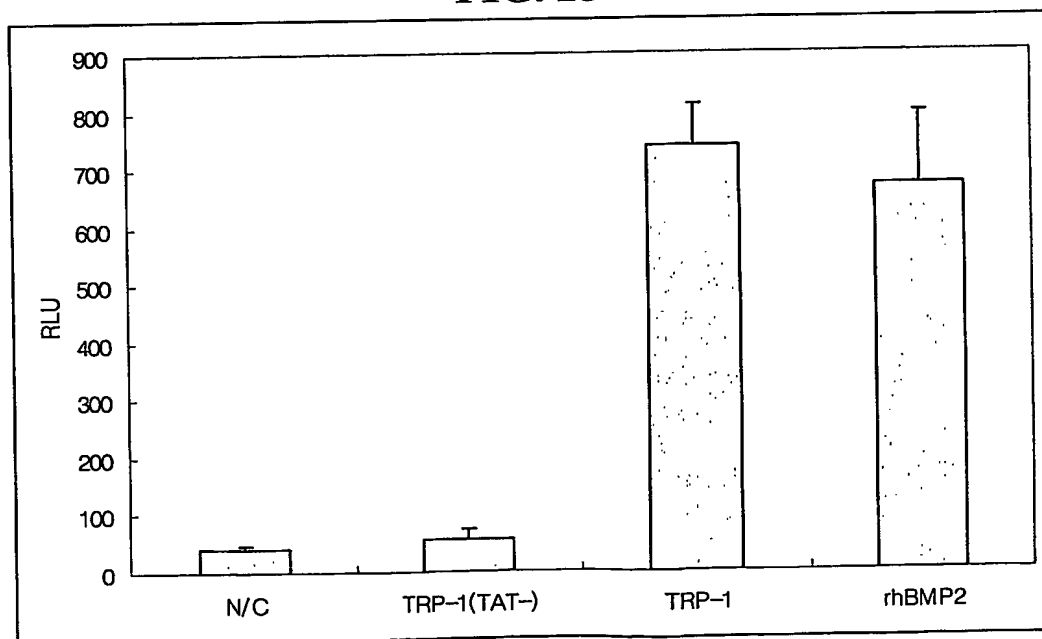
11/14
FIG. 24

FIG. 25



12/14
FIG. 26

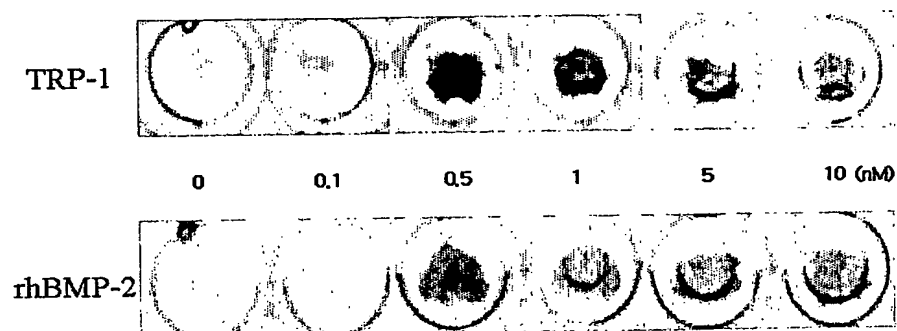
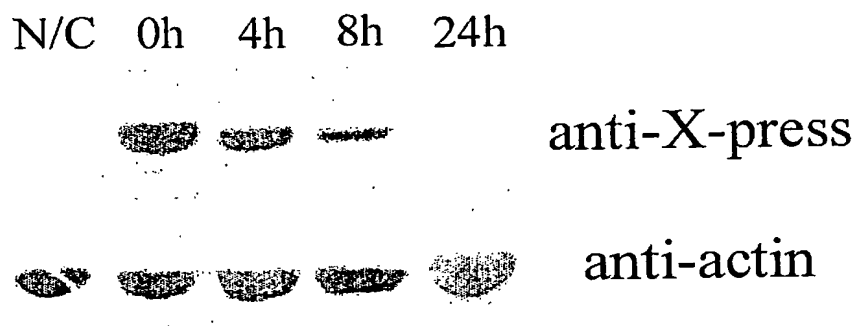


FIG. 27



13/14
FIG. 28

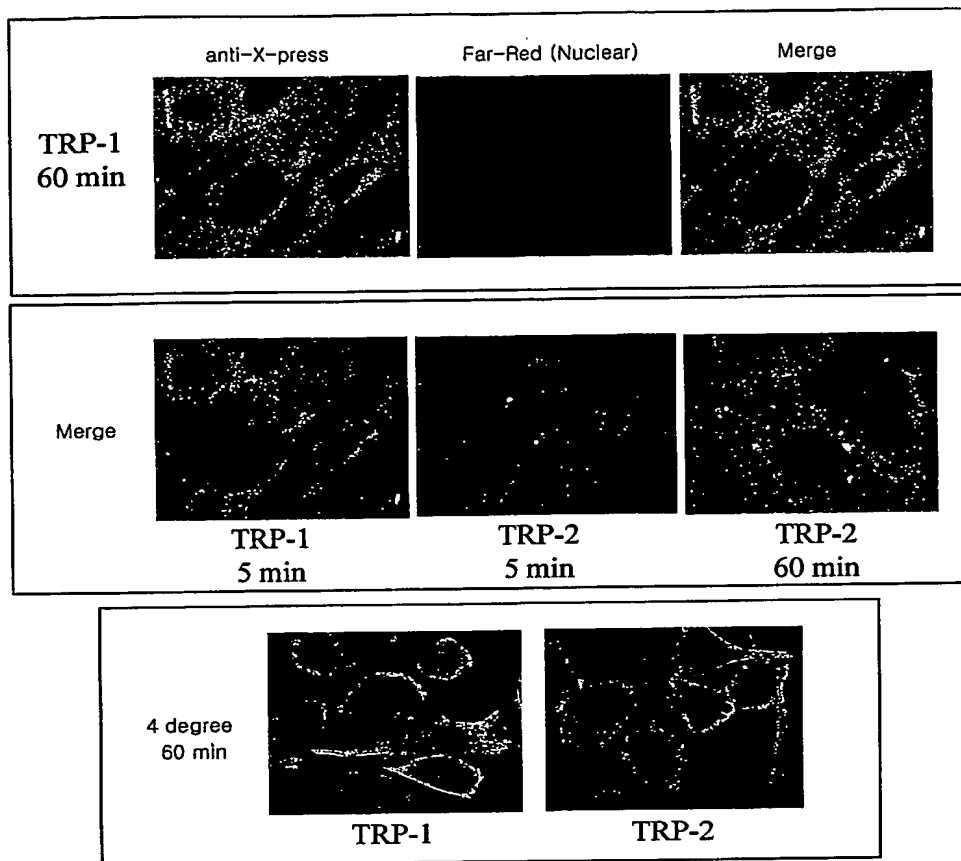
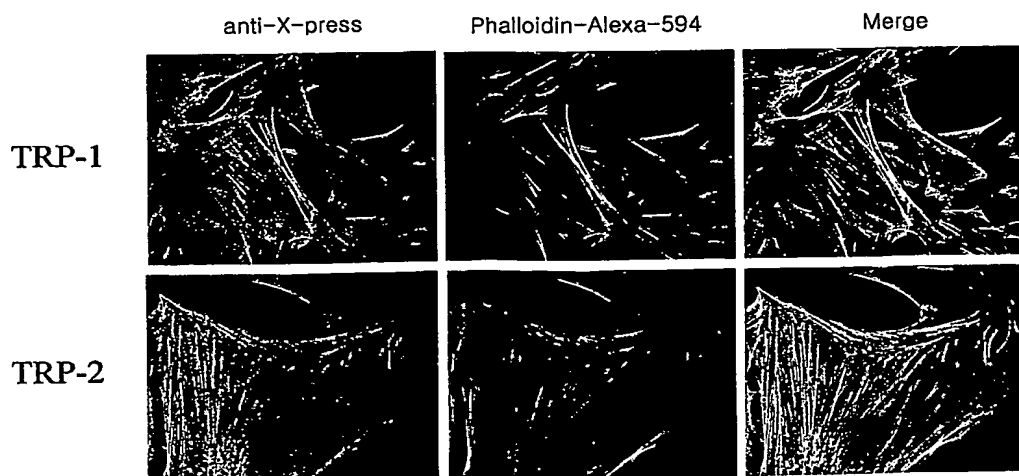


FIG. 29



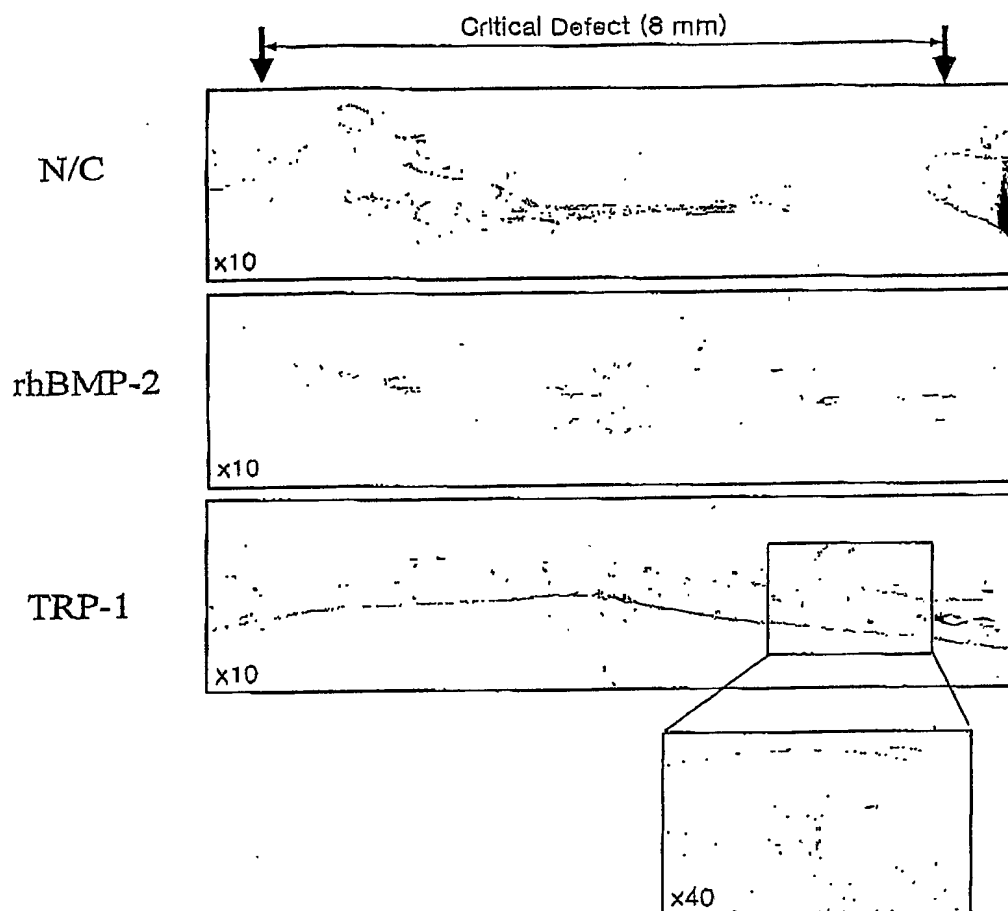
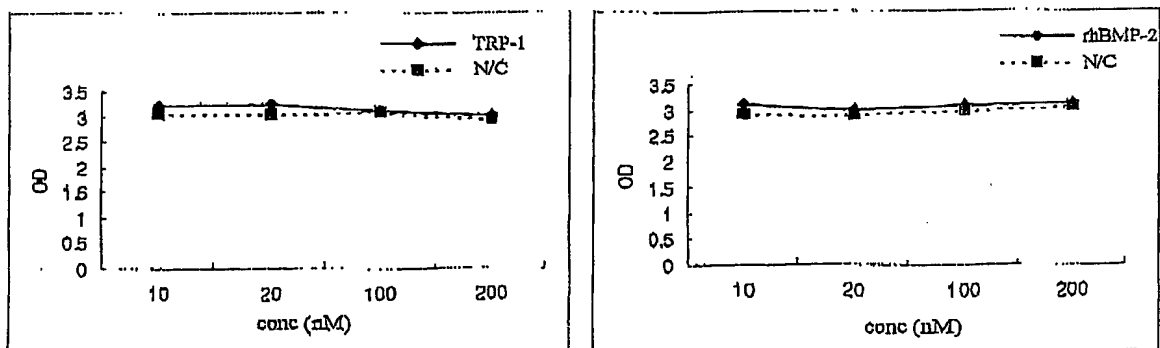
14/14
FIG. 30

FIG. 31



Sequence Listing

<110> KIM, JUNG MOON
 KIM, JUNG KOOK
 KIM, TAE HAN
 LEE, JONG SUK

<120> Non-activated Polypeptides having a function of tissue
 regeneration and method for preparing the same

<130> PP-B0180

<150> KR2005-26246
 <151> 2005-03-30

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 1
 Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg
 1 5 10 15
 His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile
 20 25 30
 Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro
 35 40 45
 Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln
 50 55 60
 Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val
 65 70 75 80
 Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu
 85 90 95

Sequence Listing

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly
 100 105 110

Cys Arg

<210> 2
 <211> 183
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2
 Ser Thr Gly Val Leu Leu Pro Leu Gln Asn Asn Glu Leu Pro Gly Ala
 1 5 10 15

Glu Tyr Gln Tyr Lys Lys Asp Glu Val Trp Glu Glu Arg Lys Pro Tyr
 20 25 30

Lys Thr Leu Gln Ala Gln Ala Pro Glu Lys Ser Lys Asn Lys Lys Lys
 35 40 45

Gln Arg Lys Gly Pro His Arg Lys Ser Gln Thr Leu Gln Phe Asp Glu
 50 55 60

Gln Thr Leu Lys Lys Ala Arg Arg Lys Gln Trp Ile Glu Pro Arg Asn
 65 70 75 80

Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser
 85 90 95

Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly
 100 105 110

Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser Leu Lys Pro Ser Asn His Ala
 115 120 125

Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val Gly Val Val Pro Gly Ile Pro
 130 135 140

Sequence Listing

Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu Phe
 145 150 155 160

Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met Thr
 165 170 175

Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg
 180

<210> 3
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3
 Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys
 1 5 10 15

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp
 20 25 30

Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp
 35 40 45

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile
 50 55 60

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys
 65 70 75 80

Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu
 85 90 95

Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly
 100 105 110

Cys Gly Cys Arg
 115

Sequence Listing

```

<210>      4
<211>      138
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens

<400>      4
Ala Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Arg Asn Lys Ser Ser Ser His
  1              5              10              15

Gln Asp Ser Ser Arg Met Ser Ser Val Gly Asp Tyr Asn Thr Ser Glu
      20              25              30

Gln Lys Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp
      35              40              45

Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe
  50              55              60

Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala
  65              70              75              80

Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp
      85              90              95

His Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser
      100              105              110

Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg
      115              120              125

Asn Met Val Val Arg Ser Cys Gly Cys His
  130              135

```

```

<210>      5
<211>      139
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens

```


Sequence Listing

<400> 5

Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser Arg Asn Arg Ser Thr Gln
 1 5 10 15

Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser
 20 25 30

Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln
 35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala
 50 55 60

Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn
 65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro
 85 90 95

Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile
 100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
 115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His
 130 135

<210> 6

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys
 1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser

Sequence Listing

```

                20                25                30
Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys  Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg
      35                40                45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp  Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala
      50                55                60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys  Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn
      65                70                75                80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val  Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro
      85                90                95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys  Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile
     100                105                110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp  Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr
     115                120                125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala  Cys Gly Cys His
     130                135

<210>      7
<211>     133
<212>     PRT
<213>    Homo sapiens

<400>      7
Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser  Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu
  1                5                10                15

Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val  His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys
     20                25                30

Arg Arg His Glu Leu Tyr Val  Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp
     35                40                45

Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly  Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu

```

Sequence Listing

```

50              55              60
Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser  Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile
65              70              75              80
Leu Gln Ser Leu Val His Leu  Met Met Pro Asp Ala Val Pro Lys Ala
85              90              95
Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu  Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp
100             105             110
Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu  Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys
115             120             125
Ala Cys Gly Cys His
130

<210>      8
<211>     110
<212>     PRT
<213>     Homo sapiens

<400>      8
Ser Ala Gly Ala Gly Ser His  Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn
1              5              10              15
Phe Glu Asp Ile Gly Trp Asp  Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr
20              25              30
Glu Ala Tyr Glu Cys Lys Gly  Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Asp Asp
35              40              45
Val Thr Pro Thr Lys His Ala  Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys
50              55              60
Phe Pro Thr Lys Val Gly Lys  Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser
65              70              75              80
Pro Ile Ser Val Leu Tyr Lys  Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys

```

Sequence Listing

85 90 95

Tyr His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105 110

<210> 9
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 9
 Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu
 20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu
 35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
 50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys
 85 90 95

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105

<210> 10
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 10

Sequence Listing

Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
 1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu
 20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu
 35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
 50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
 65 70 75 80

Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys
 85 90 95

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
 100 105

<210> 11
 <211> 104
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 11
 Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly
 1 5 10 15

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys
 20 25 30

Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
 35 40 45

His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala
 50 55 60

Sequence Listing

Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu
 65 70 75 80

Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
 85 90 95

Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Arg
 100

<210> 12
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 12
 Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg
 1 5 10 15

Leu Arg Cys Ser Lys Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly
 20 25 30

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys
 35 40 45

Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
 50 55 60

His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr
 65 70 75 80

Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu
 85 90 95

Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
 100 105 110

Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 115 120

Sequence Listing

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly
 20 25 30
 Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys
 35 40 45
 Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn
 50 55 60
 His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr
 65 70 75 80
 Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu
 85 90 95
 Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met
 100 105 110
 Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg
 115 120

<210> 14
 <211> 281
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 14
 Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val
 1 5 10 15

Sequence Listing

Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys
 20 25 30

Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu
 35 40 45

Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys
 50 55 60

Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu
 65 70 75 80

Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp
 85 90 95

His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe
 100 105 110

His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr Ser Gly Lys Thr
 115 120 125

Thr Arg Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu Glu Phe
 130 135 140

Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln Met Gln Asp Ala
 145 150 155 160

Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile
 165 170 175

Ile Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Arg Leu Leu
 180 185 190

Asp Thr Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp
 195 200 205

Val Thr Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala Gly His Ala Asn His Gly
 210 215 220

Sequence Listing

Phe Val Val Glu Val Ala His Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser Lys
 225 230 235 240

Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu His Gln Asp Glu His Ser Trp
 245 250 255

Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Lys Gly
 260 265 270

His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg
 275 280

<210> 15
 <211> 289
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 15
 Met Ala Gly Ala Ser Arg Leu Leu Phe Leu Trp Leu Gly Cys Phe Cys
 1 5 10 15

Val Ser Leu Ala Gln Gly Glu Arg Pro Lys Pro Pro Phe Pro Glu Leu
 20 25 30

Arg Lys Ala Val Pro Gly Asp Arg Thr Ala Gly Gly Gly Pro Asp Ser
 35 40 45

Glu Leu Gln Pro Gln Asp Lys Val Ser Glu His Met Leu Arg Leu Tyr
 50 55 60

Asp Arg Tyr Ser Thr Val Gln Ala Ala Arg Thr Pro Gly Ser Leu Glu
 65 70 75 80

Gly Gly Ser Gln Pro Trp Arg Pro Arg Leu Leu Arg Glu Gly Asn Thr
 85 90 95

Val Arg Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Glu Thr Leu Glu Arg Lys Gly
 100 105 110

Sequence Listing

Leu Tyr Ile Phe Asn Leu Thr Ser Leu Thr Lys Ser Glu Asn Ile Leu
 115 120 125
 Ser Ala Thr Leu Tyr Phe Cys Ile Gly Glu Leu Gly Asn Ile Ser Leu
 130 135 140
 Ser Cys Pro Val Ser Gly Gly Cys Ser His His Ala Gln Arg Lys His
 145 150 155 160
 Ile Gln Ile Asp Leu Ser Ala Trp Thr Leu Lys Phe Ser Arg Asn Gln
 165 170 175
 Ser Gln Leu Leu Gly His Leu Ser Val Asp Met Ala Lys Ser His Arg
 180 185 190
 Asp Ile Met Ser Trp Leu Ser Lys Asp Ile Thr Gln Phe Leu Arg Lys
 195 200 205
 Ala Lys Glu Asn Glu Glu Phe Leu Ile Gly Phe Asn Ile Thr Ser Lys
 210 215 220
 Gly Arg Gln Leu Pro Lys Arg Arg Leu Pro Phe Pro Glu Pro Tyr Ile
 225 230 235 240
 Leu Val Tyr Ala Asn Asp Ala Ala Ile Ser Glu Pro Glu Ser Val Val
 245 250 255
 Ser Ser Leu Gln Gly His Arg Asn Phe Pro Thr Gly Thr Val Pro Lys
 260 265 270
 Trp Asp Ser His Ile Arg Ala Ala Leu Ser Ile Glu Arg Arg Lys Lys
 275 280 285

Arg

<210> 16
 <211> 292
 <212> PRT

Sequence Listing

<213> Homo sapiens

<400> 16

Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val

1 5 10 15

Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys

20 25 30

Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly

35 40 45

Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met

50 55 60

Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro

65 70 75 80

Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu

85 90 95

Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser

100 105 110

Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn

115 120 125

Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu

130 135 140

Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu

145 150 155 160

Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His

165 170 175

Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro

180 185 190

Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn

Sequence Listing

```

195                200                205

Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
210                215                220

Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
225                230                235                240

Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
245                250                255

Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
260                265                270

Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
275                280                285

Arg Ala Lys Arg
290

<210>    17
<211>    316
<212>    PRT
<213>    Homo sapiens

<400>    17
Met His Leu Thr Val Phe Leu Leu Lys Gly Ile Val Gly Phe Leu Trp
1          5          10          15

Ser Cys Trp Val Leu Val Gly Tyr Ala Lys Gly Gly Leu Gly Asp Asn
20          25          30

His Val His Ser Ser Phe Ile Tyr Arg Arg Leu Arg Asn His Glu Arg
35          40          45

Arg Glu Ile Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg
50          55          60

Pro Arg Pro Phe Ser Pro Gly Lys Gln Ala Ser Ser Ala Pro Leu Phe

```

Sequence Listing

65	70	75	80
Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala	Met Thr Asn Glu Glu Asn Pro Glu Glu		
85	90	95	
Ser Glu Tyr Ser Val Arg Ala	Ser Leu Ala Glu Glu Thr Arg Gly Ala		
100	105	110	
Arg Lys Gly Tyr Pro Ala Ser	Pro Asn Gly Tyr Pro Arg Arg Ile Gln		
115	120	125	
Leu Ser Arg Thr Thr Pro Leu	Thr Thr Gln Ser Pro Pro Leu Ala Ser		
130	135	140	
Leu His Asp Thr Asn Phe Leu	Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe		
145	150	155	160
Val Asn Leu Val Glu Arg Asp	Lys Asp Phe Ser His Gln Arg Arg His		
165	170	175	
Tyr Lys Glu Phe Arg Phe Asp	Leu Thr Gln Ile Pro His Gly Glu Ala		
180	185	190	
Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg	Ile Tyr Lys Asp Arg Ser Asn Asn Arg		
195	200	205	
Phe Glu Asn Glu Thr Ile Lys	Ile Ser Ile Tyr Gln Ile Ile Lys Glu		
210	215	220	
Tyr Thr Asn Arg Asp Ala Asp	Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Lys Ala		
225	230	235	240
Gln Ala Leu Asp Val Gly Trp	Leu Val Phe Asp Ile Thr Val Thr Ser		
245	250	255	
Asn His Trp Val Ile Asn Pro	Gln Asn Asn Leu Gly Leu Gln Leu Cys		
260	265	270	
Ala Glu Thr Gly Asp Gly Arg	Ser Ile Asn Val Lys Ser Ala Gly Leu		
275	280	285	

Sequence Listing

Val Gly Arg Gln Gly Pro Gln Ser Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe
 290 295 300

Phe Lys Ala Ser Glu Val Leu Leu Arg Ser Val Arg
 305 310 315

<210> 18
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Pro Gly Leu Gly Arg Arg Ala Gln Trp Leu Cys Trp Trp Trp Gly
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Cys Cys Gly Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly
 35 40 45

Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser
 50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro Leu
 85 90 95

His Gly Leu Gln Gln Pro Gln Pro Pro Ala Leu Arg Gln Gln Glu Glu
 100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Pro Arg Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg
 115 120 125

Leu Lys Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Leu Ser
 130 135 140

Sequence Listing

Ala Asp Asn Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu Gly Glu Arg Gln Gln Ser
 145 150 155 160

Trp Pro His Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gln Arg Arg Gln Pro Pro Pro
 165 170 175

Gly Ala Ala His Pro Leu Asn Arg Lys Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ser
 180 185 190

Gly Ser Gly Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ala Gln Asp Ser Ala Phe
 195 200 205

Leu Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu Tyr
 210 215 220

Asp Lys Glu Phe Ser Pro Arg Gln Arg His His Lys Glu Phe Lys Phe
 225 230 235 240

Asn Leu Ser Gln Ile Pro Glu Gly Glu Val Val Thr Ala Ala Glu Phe
 245 250 255

Arg Ile Tyr Lys Asp Cys Val Met Gly Ser Phe Lys Asn Gln Thr Phe
 260 265 270

Leu Ile Ser Ile Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Gln His Arg Asp Ser
 275 280 285

Asp Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Val Val Trp Ala Ser Glu Glu Gly
 290 295 300

Trp Leu Glu Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn Leu Trp Val Val Thr
 305 310 315 320

Pro Gln His Asn Met Gly Leu Gln Leu Ser Val Val Thr Arg Asp Gly
 325 330 335

Val His Val His Pro Arg Ala Ala Gly Leu Val Gly Arg Asp Gly Pro
 340 345 350

Sequence Listing

Tyr Asp Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Val Ser Glu Val
 355 360 365

His Val Arg Thr Thr Arg
 370

<210> 19
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 19
 Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala
 1 5 10 15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser
 20 25 30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser
 35 40 45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu
 50 55 60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro
 65 70 75 80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly
 85 90 95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser
 100 105 110

Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr
 115 120 125

Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys
 130 135 140

Sequence Listing

Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu
 145 150 155 160

Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile
 165 170 175

Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile
 180 185 190

Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu
 195 200 205

Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu
 210 215 220

Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg
 225 230 235 240

His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser
 245 250 255

Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn
 260 265 270

Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe
 275 280 285

Arg Ser Ile Arg
 290

<210> 20

<211> 269

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 20

Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
 1 5 10 15

Sequence Listing

Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro Gly Cys Pro
 20 25 30

Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln Arg Glu Ile
 35 40 45

Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Pro Pro
 50 55 60

Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu
 65 70 75 80

Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Glu
 85 90 95

Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val
 100 105 110

Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe
 115 120 125

Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala
 130 135 140

Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
 145 150 155 160

Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser Asn Arg Glu
 165 170 175

Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu
 180 185 190

Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu
 195 200 205

Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp
 210 215 220

Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gln Arg Ala

Sequence Listing

```

225                230                235                240
Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro
                245                250                255

Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg
                260                265

<210>      21
<211>      318
<212>      PRT
<213>      Homo sapiens

<400>      21
Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu
  1              5              10              15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser
                20              25              30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu
                35              40              45

Pro Glu His Thr Phe Asn Leu Lys Met Phe Leu Glu Asn Val Lys Val
                50              55              60

Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys
                65              70              75              80

Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr
                85              90              95

Thr Ser Asp Lys Ser Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe Ser
                100             105             110

Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe Gln
                115             120             125

Lys His Ile Leu Leu Phe Asn Ile Ser Ile Pro Arg His Glu Gln Ile

```

Sequence Listing

130	135	140
Thr Arg Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Val Ser Cys Gln Asn His Val Asp		
145	150	155 160
Pro Ser His Asp Leu Lys Gly Ser Val Val Ile Tyr Asp Val Leu Asp		
165	170	175
Gly Thr Asp Ala Trp Asp Ser Ala Thr Glu Thr Lys Thr Phe Leu Val		
180	185	190
Ser Gln Asp Ile Gln Asp Glu Gly Trp Glu Thr Leu Glu Val Ser Ser		
195	200	205
Ala Val Lys Arg Trp Val Arg Ser Asp Ser Thr Lys Ser Lys Asn Lys		
210	215	220
Leu Glu Val Thr Val Glu Ser His Arg Lys Gly Cys Asp Thr Leu Asp		
225	230	235 240
Ile Ser Val Pro Pro Gly Ser Arg Asn Leu Pro Phe Phe Val Val Phe		
245	250	255
Ser Asn Asp His Ser Ser Gly Thr Lys Glu Thr Arg Leu Glu Leu Arg		
260	265	270
Glu Met Ile Ser His Glu Gln Glu Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser Lys		
275	280	285
Asp Gly Ser Thr Glu Ala Gly Glu Ser Ser His Glu Glu Asp Thr Asp		
290	295	300
Gly His Val Ala Ala Gly Ser Thr Leu Ala Arg Arg Lys Arg		
305	310	315
<210>	22	
<211>	316	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	

Sequence Listing

<400> 22

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu
 20 25 30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly
 35 40 45

Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys
 50 55 60

Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp
 65 70 75 80

Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg
 85 90 95

Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp
 100 105 110

Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu
 115 120 125

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu
 130 135 140

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly
 145 150 155 160

Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp
 165 170 175

Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr
 180 185 190

Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg
 195 200 205

Sequence Listing

Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile
 210 215 220

Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe
 245 250 255

Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu
 260 265 270

Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp
 275 280 285

Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser
 290 295 300

Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg
 305 310 315

<210> 23
 <211> 316
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 23
 Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala
 1 5 10 15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu
 20 25 30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly
 35 40 45

Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys
 50 55 60

Sequence Listing

Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp
 65 70 75 80

Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg
 85 90 95

Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp
 100 105 110

Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu
 115 120 125

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu
 130 135 140

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly
 145 150 155 160

Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp
 165 170 175

Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr
 180 185 190

Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg
 195 200 205

Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile
 210 215 220

Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe
 245 250 255

Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu
 260 265 270

Sequence Listing

Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp
 275 280 285

Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser
 290 295 300

Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg
 305 310 315

<210> 24
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24
 Met Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Cys Leu Trp Leu Leu Ser Ala
 1 5 10 15

Cys Arg Pro Arg Asp Gly Leu Glu Ala Ala Ala Val Leu Arg Ala Ala
 20 25 30

Gly Ala Gly Pro Val Arg Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly
 35 40 45

Gly Gly Arg Thr Leu Ala Gln Ala Ala Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala
 50 55 60

Ala Ala Val Pro Arg Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Gly Ser Gly
 65 70 75 80

Phe Arg Asn Gly Ser Val Val Pro His His Phe Met Met Ser Leu Tyr
 85 90 95

Arg Ser Leu Ala Gly Arg Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ala Val Ser Ala
 100 105 110

Ser Gly His Gly Arg Ala Asp Thr Ile Thr Gly Phe Thr Asp Gln Ala
 115 120 125

Sequence Listing

Thr Gln Asp Glu Ser Ala Ala Glu Thr Gly Gln Ser Phe Leu Phe Asp
 130 135 140

Val Ser Ser Leu Asn Asp Ala Asp Glu Val Val Gly Ala Glu Leu Arg
 145 150 155 160

Val Leu Arg Arg Gly Ser Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Trp Thr Ser
 165 170 175

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Ala Ala Arg Ala Pro
 180 185 190

Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu Pro Leu Val Gly Gln Arg Trp
 195 200 205

Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met Arg Arg His Arg Arg Glu Pro
 210 215 220

Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu Leu Arg Ala Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240

Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe Gly Trp Pro Gly
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Leu Val Val Ser Ser
 260 265 270

Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile Arg Ala Gln Ala
 275 280 285

Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser Glu Pro Leu Pro Asp Pro Gly
 290 295 300

Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val Ile Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 305 310 315 320

Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg

Sequence Listing

340

345

<210> 25
 <211> 335
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 25
 Met Asp Thr Pro Arg Val Leu Leu Ser Ala Val Phe Leu Ile Ser Phe
 1 5 10 15
 Leu Trp Asp Leu Pro Gly Phe Gln Gln Ala Ser Ile Ser Ser Ser Ser
 20 25 30
 Ser Ser Ala Glu Leu Gly Ser Thr Lys Gly Met Arg Ser Arg Lys Glu
 35 40 45
 Gly Lys Met Gln Arg Ala Pro Arg Asp Ser Asp Ala Gly Arg Glu Gly
 50 55 60
 Gln Glu Pro Gln Pro Arg Pro Gln Asp Glu Pro Arg Ala Gln Gln Pro
 65 70 75 80
 Arg Ala Gln Glu Pro Pro Gly Arg Gly Pro Arg Val Val Pro His Glu
 85 90 95
 Tyr Met Leu Ser Ile Tyr Arg Thr Tyr Ser Ile Ala Glu Lys Leu Gly
 100 105 110
 Ile Asn Ala Ser Phe Phe Gln Ser Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ile Thr
 115 120 125
 Ser Phe Val Asp Arg Gly Leu Asp Asp Leu Ser His Thr Pro Leu Arg
 130 135 140
 Arg Gln Lys Tyr Leu Phe Asp Val Ser Met Leu Ser Asp Lys Glu Glu
 145 150 155 160
 Leu Val Gly Ala Glu Leu Arg Leu Phe Arg Gln Ala Pro Ser Ala Pro

Sequence Listing

165	170	175
Trp Gly Pro Pro Ala Gly Pro	Leu His Val Gln Leu Phe Pro Cys Leu	
180	185	190
Ser Pro Leu Leu Leu Asp Ala	Arg Thr Leu Asp Pro Gln Gly Ala Pro	
195	200	205
Pro Ala Gly Trp Glu Val Phe	Asp Val Trp Gln Gly Leu Arg His Gln	
210	215	220
Pro Trp Lys Gln Leu Cys Leu	Glu Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Leu	
225	230	235
Asp Ala Gly Glu Ala Glu Ala	Arg Ala Arg Gly Pro Gln Gln Pro Pro	
245	250	255
Pro Pro Asp Leu Arg Ser Leu	Gly Phe Gly Arg Arg Val Arg Pro Pro	
260	265	270
Gln Glu Arg Ala Leu Leu Val	Val Phe Thr Arg Ser Gln Arg Lys Asn	
275	280	285
Leu Phe Ala Glu Met Arg Glu	Gln Leu Gly Ser Ala Glu Ala Ala Gly	
290	295	300
Pro Gly Ala Gly Ala Glu Gly	Ser Trp Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro	
305	310	315
Asp Ala Arg Pro Trp Leu Pro	Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg	
325	330	335
<210>	26	
<211>	381	
<212>	PRT	
<213>	Homo sapiens	
<400>	26	
Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu	Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp	

Sequence Listing

1	5	10	15
Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly	20	25	30
Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys	35	40	45
Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser	50	55	60
Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr	65	70	75
Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys	85	90	95
Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro	100	105	110
Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu	115	120	125
Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe	130	135	140
Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu	145	150	155
Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu	165	170	175
Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val	180	185	190
Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys	195	200	205
Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe	210	215	220

Sequence Listing

Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240

Ile Leu Arg Lys Lys Pro Ser Asp Thr Ala Lys Pro Ala Ala Pro Gly
 245 250 255

Gly Gly Arg Ala Ala Gln Leu Lys Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gly Arg
 260 265 270

Gln Pro Ala Ser Leu Leu Asp Val Arg Ser Val Pro Gly Leu Asp Gly
 275 280 285

Ser Gly Trp Glu Val Phe Asp Ile Trp Lys Leu Phe Arg Asn Phe Lys
 290 295 300

Asn Ser Ala Gln Leu Cys Leu Glu Leu Glu Ala Trp Glu Arg Gly Arg
 305 310 315 320

Ala Val Asp Leu Arg Gly Leu Gly Phe Asp Arg Ala Ala Arg Gln Val
 325 330 335

His Glu Lys Ala Leu Phe Leu Val Phe Gly Arg Thr Lys Lys Arg Asp
 340 345 350

Leu Phe Phe Asn Glu Ile Lys Ala Arg Ser Gly Gln Asp Asp Lys Thr
 355 360 365

Val Tyr Glu Tyr Leu Phe Ser Gln Arg Arg Lys Arg Arg
 370 375 380

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*C07K 19/00(2006.01)i, C07K 14/51(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 8: C07K 19/00, C07K 14/51

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
PubMed "BMP, furin, TAT", NCBI, eKIPASS**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	Leighton, M., et al. "Paired Basic/Furin-like Proprotein Convertase Cleavage of Pro-BMP-1 in the trans-Golgi Network" J. Biol. Chem., 11 March 2003, Vol. 278(20); pages 18478-18484, See abstract and result.	1-22
Y	Bettaccini, A.A., et al. "Proliferative activity of extracellular HIV-1 Tat protein in human epithelial cells: expression profile of pathogenetically relevant genes" BMC Microbiol., 27 April 2005, Vol. 5(1); pages 20-, See abstract.	1-22
A	Degnin, C., et al. "Cleavages within the prodomain direct intracellular trafficking and degradation of mature bone morphogenetic protein-4" Mol. Biol. Cell., November 2004, Vol. 15(11): pages 5012-5020, See entire document.	1-22
A	Cui, Y., et al. "The activity and signaling range of mature BMP-4 is regulated by sequential cleavage at two sites within the prodomain of the precursor" Gene & Dev. 01 November 2001, Vol. 15(21): pages 2797-2802, See entire document.	1-22

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

28 JULY 2006 (28.07.2006)

Date of mailing of the international search report

31 JULY 2006 (31.07.2006)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
920 Dunsan-dong, Seo-gu, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

PARK, JEONG UNG

Telephone No. 82-42-481-8159



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2005/003660

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



on paper



in electronic form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in electronic form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/KR2005/003660

International filing date: 02 November 2005 (02.11.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: KR
Number: 10-2005-0103040
Filing date: 31 October 2005 (31.10.2005)

Date of receipt at the International Bureau: 13 January 2006 (13.01.2006)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office

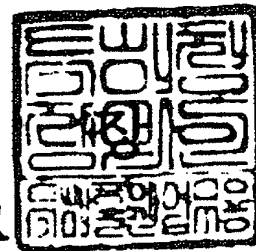
출 원 번 호 : 특허출원 2005년 제 0103040 호
Application Number 10-2005-0103040

출 원 일 자 : 2005년 10월 31일
Date of Application OCT 31, 2005

출 원 인 : 김정문 외 3 명
Applicant(s) KIM, JUNG MOON, et al

2006 년 01 월 13 일

특 허 청
COMMISSIONER



【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2005. 10. 31
【발명의 국문명칭】	조직재생 기능을 가지는 비활성 폴리펩티드 및 그 제조방법
【발명의 영문명칭】	Non-activated Polypeptides Having a Function of Tissue Regeneration and Method for Preparing the Same
【출원인】	
【성명】	김정문
【출원인코드】	4-2000-055426-6
【출원인】	
【성명】	육종인
【출원인코드】	4-1998-046259-5
【대리인】	
【성명】	이처영
【대리인코드】	9-2003-000118-9
【포괄위임등록번호】	2005-080963-1
【포괄위임등록번호】	2005-080962-3
【발명자】	
【성명】	육종인
【출원인코드】	4-1998-046259-5
【발명자】	
【성명】	김정문
【출원인코드】	4-2000-055426-6
【발명자】	
【성명】	이종석
【성명의 영문표기】	LEE Jong Suk

【주민등록번호】 710121-1079111
【우편번호】 135-270
【주소】 서울시 강남구 도곡동 91-5번지 도곡동삼성래미안아파트
104-1903호

【국적】 KR

【발명자】

【성명】 김정국
【성명의 영문표기】 KIM Jung Kook
【주민등록번호】 541225-1046720
【우편번호】 140-031
【주소】 서울시 용산구 이촌1동 430번지 LG 한강자이아파트
101-2401호

【국적】 KR

【발명자】

【성명】 김태한
【성명의 영문표기】 KIM Tae-Han
【주민등록번호】 571110-1810158
【우편번호】 463-010
【주소】 경기도 성남시 분당구 정자동 170-1번지 아데나루체 A동
903호

【국적】 KR

【우선권 주장】

【출원국명】 KR
【출원종류】 특허
【출원번호】 10-2005-0026246
【출원일자】 2005.03.30
【증명서류】 미첨부

【심사청구】 청구

【핵산염기 및 아미노산 서열목록】

 【서열개수】 26

 【서열목록의 전자문서】 첨부

【취지】 특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인

이처영 (인)

【수수료】

 【기본출원료】 0 면 38,000 원

 【가산출원료】 66 면 0 원

 【우선권주장료】 1 건 20,000 원

 【심사청구료】 22 항 813,000 원

 【합계】 871,000 원

 【감면사유】 개인(70%감면)

 【감면후 수수료】 275,300 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 세포막 수용체의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD(protein transduction domain); 하나 이상의 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD(tissue regeneration domain)를 세포 내에서 활성화시키는 FAD(furin activation domain); 및 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 활성화되어 세포내에서 조직의 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 TRD를 함유하는 비활성 폴리펩티드(TRPs: tissue regenerative polypeptides) 및 그 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 TRPs는 실용적으로 재조합 대장균과 같은 박테리아의 배양에 의해 대량생산이 가능하고, 생체 투여 전에는 비활성 상태이기 때문에, 종래 유사 용도의 활성 단백질에 비해 그 생산비용이 수십분의 일에 불과하고, 분리·정제 및 취급·투약 과정이 매우 간단하고 편리하다. 본 발명에 따른 비활성 TRPs를 생체 내에 투약할 경우, 종래에 알려진 rhBMP류나 TGF- β 류와는 전혀 다른 약리기전에 의해 뼈, 연골 등 조직의 형성 또는 재생을 촉진하거나 신장, 간, 폐, 심장 등 장기의 섬유화 및 경화를 해소시킬 수 있어 새로운 메카니즘의 신약으로 유용하다.

【대표도】

도 6

【색인어】

조직형성, 조직재생, PTD, FAD, TRD, 비활성 TRP, BMP

【명세서】

【발명의 명칭】

조직재생 기능을 가지는 비활성 폴리펩티드 및 그 제조방법{Non-activated Polypeptides Having a Function of Tissue Regeneration and Method for Preparing the Same}

【도면의 간단한 설명】

- <1> 도 1은 사람의 BMP2, BMP7과 TGF- β 단백질의 구조 모식도와 전체 아미노산 배열을 나타낸 것이다.
- <2> 도 2는 종래 시판되는 rhBMP-2의 2차 및 3차 구조를 나타내는 사진이다.
- <3> 도 3은 본 발명에 따른 TRP-1의 제조 및 분리·정제과정을 도시한 것이다.
- <4> 도 4는 종래 rhBMP의 제조 및 분리정제과정을 도시한 것이다.
- <5> 도 5는 종래 rhBMP의 약리기전을 나타낸 것이다.
- <6> 도 6은 본 발명에 따른 비활성 TRPs의 약리기전을 나타낸 것이다.
- <7> 도 7은 hBMP2 유전자에 TAT를 결합한 재조합 발현벡터를 나타낸 것이다.
- <8> 도 8은 도 7의 재조합 발현벡터로 형질전환된 대장균 BL21의 배양시 IPTG로 단백질 발현을 유도하기 이전과 이후의 전체 단백질에 대한 전기영동 사진이다.
- <9> 도 9는 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용하여 TAT-BMP2를 웨스턴 블랏(western blot)한 결과를 나타낸 것이다.
- <10> 도 10은 TAT-BMP2가 세포막을 투과하여 세포내로 이동하는 것을 확인한 웨스

턴 블랏 사진이다.

<11> 도 11은 TAT-BMP2의 alkaline phosphatase (ALP) 활성을 나타내는 사진이다.

<12> 도 12는 TAT-BMP2와 시판중인 rhBMP-2로 처리된 섬유아세포를 폰 코사(von Kossa) 염색 처리하여 골세포 분화와 석회화 물질을 형성여부를 확인한 사진이다.

<13> 도 13은 mRNA 이동을 조절하는 것으로 예상되는 시그널펩티드와 퓨린에 의해 활성화되는 프로도메인을 BMP2와 결합시키고, 퓨린 활성 기전을 확인하기 위해 고안된 TRP-1 변이체의 모식도이다.

<14> 도 14는 본 발명에 따른 TRP-1 및 그 변이체가 세포막을 투과하여 세포내로 이동하는 것을 확인한 웨스턴 블랏 사진이다.

<15> 도 15는 본 발명에 따른 TRP-1이 퓨린에 의해 시험관 내에서 절단되는 것을 나타낸 사진이다.

<16> 도 16은 본 발명에 따른 TRP-1이 세포내에서 퓨린에 의해 활성화되는 것을 α 1-PDX와 항 X-press의 웨스턴 블랏으로 확인한 것이다.

<17> 도 17은 본 발명에 따른 TRP-1 및 그 변이체로 처리된 섬유아세포에서 ALP 활성도를 측정한 것이다.

<18> 도 18은 본 발명에 따른 TRP-1과 그 변이체로 처리된 섬유아세포를 폰 코사(von Kossa) 염색하여 골세포 분화와 석회화 물질을 형성여부를 확인한 것이다.

<19> 도 19는 본 발명에 따른 재조합 대장균 배양시 IPTG로 TRP-1 및 TRP-2 발현을 유도하기 이전과 이후의 전체 단백질에 대한 전기영동 사진이다.

- <20> 도 20은 본 발명에 따른 TRP-1과 TRP-2를 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용하여 웨스턴 블랏(western blot)한 결과를 나타낸 것이다.
- <21> 도 21은 본 발명에 따른 TRP-1이 세포내로 도입되는 과정을 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용하여 웨스턴 블랏(western blot)한 결과를 나타낸 것이다.
- <22> 도 22는 본 발명에 따른 TRP-2가 세포내로 도입되는 과정을 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용하여 웨스턴 블랏(western blot)한 결과를 나타낸 것이다.
- <23> 도 23은 본 발명에 따른 TRP-1로 처리된 섬유아세포에서 활성화된 hBMP2의 분비를 웨스턴 블랏으로 확인한 것이다.
- <24> 도 24는 본 발명에 따른 TRP-1과 시판중인 rhBMP-2로 처리된 섬유아세포를 폰 코사(von Kossa) 염색하여 골세포 분화와 석회화 물질 형성여부를 확인한 것이다.
- <25> 도 25는 본 발명에 따른 TRP-1과 시판중인 rhBMP-2로 처리된 섬유아세포에서 ALP 활성도를 측정한 것이다.
- <26> 도 26은 다양한 농도의 TRP-1 및 rhBMP-2로 처리된 섬유아세포를 폰 코사(von Kossa) 염색하여 골세포 분화와 석회화 물질 형성여부를 확인한 사진이다.
- <27> 도 27은 본 발명에 따른 TRP-1이 세포내부로 도입된 후, 그 반감기를 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용하여 웨스턴 블랏(western blot)한 결과를 나타낸 것이다.

<28> 도 28은 본 발명에 따른 TRP-1과 TRP-2의 세포내 투과와 온도 영향을 공초점 (confocal) 현미경으로 관찰한 사진이다.

<29> 도 29는 본 발명에 따른 TRP-1과 TRP-2가 세포내로 투과된 후 F-actin에 특이적으로 결합하는 것을 나타낸 사진이다.

<30> 도 30은 본 발명에 따른 TRP-1이 투여된 실험동물에서 골 형성이 유도되는 것을 나타낸 사진이다.

<31> 도 31은 본 발명에 따른 TRP-1과 시판중인 기존의 rhBMP-2의 세포독성을 비교하여 나타낸 것이다.

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

<32> 본 발명은 세포막 수용체의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD(protein transduction domain)와 하나 이상의 프로프로테인 컨버타제 (proprotein convertase) 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD(tissue regeneration domain)를 세포 내에서 활성화시키는 FAD(furin activation domain) 및 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 활성화되어 세포내에서 조직의 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 TRD를 함유하는 비활성 폴리펩티드(TRPs: tissue regenerative polypeptides) 및

그 제조방법에 관한 것이다.

<33>

골 형성 단백질(Bone Morphogenetic Proteins: BMP)은 탈무기질화 조건에서 콜라겐 또는 생분해성 고분자 등과 함께 사용할 경우, 포유류나 영장류에서 골 결손의 치유를 촉진하고, 특히, 골 세포에서 분비되어 인접 세포막의 수용체를 통해 골 형성을 유도하는 것으로 알려져 있다. hBMP는 서로 유사성을 갖는 단백질군으로, 현재까지 hBMP2 내지 hBMP15 등 14가지 이상이 알려져 있으며, hBMP2, 3, 4, 6, 7 및 14는 골 재생을 유도하는 효과를 가지는 것으로 보고되어 있다. 이중, hBMP2는 현재까지 가장 확실한 골 형성 인자 단백질이며, 최근 이 단백질의 의학적 효과와 적용에 대해 많은 연구가 진행되고 있다. BMP7은 TGF- β 1의 길항작용(antagoist)을 통해 장기의 섬유화를 억제할 뿐만 아니라, 장기 재생을 유도한다고 알려져 있다 (*Nature Med.*, 9:964, 2003; *J. Biol. Chem.*, 280:8094, 2005). BMP14 (GDF-5, growth/differentiation factor-5: MP-25)는 인체나 포유류 동물에 투입할 경우 피부의 상처를 효과적으로 치유하게 하는 기능과 위나 십이지장 궤양의 치유를 도와주는 효과가 있는 것으로 알려져 있다 (US 6,764,994; *Nature*, 368:639, 1994; *Exp. Cell Res.*, 235:218, 1997; *Neurosurg Focus*, 13:1, 2002; US 6,531,450). 즉, BMP는 그 용어적 정의와는 달리 뼈나 연골 형성 촉진 기능 뿐 아니라, 피부의 재생, 위장 조직의 재생 재활 기능도 가질 수 있으며, 간이나 신장 경화의 경우에는 TGF- β 를 길항하여 섬유 조직 형성을 억제하고 정상 조직의 회복을 유도하는 기능도 알려져 있다.

<34> BMP 류를 제조하는 방법으로, 초기에는 비탈회(demineralized)된 동물 골 조직으로부터 자연염(natural salt)을 이용하여 추출하는 방법(US 4,294,753)이 시도되어 왔으나, 효율이 너무 낮고 대량 생산이 불가능한 문제점이 있었다. 1990년대 초반 BMP 유전자로 형질전환된 CHO 세포를 배양하여 활성화된 재조합 hBMP2를 분리·정제하는 방법(*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87:2220, 1990)이 개발된 이후, 대량생산이 가능하게 되었다 (US 4,968,590; 5,106,626; 5,106,748; 5,166,058; 5,187,076; 5,187,623; 5,208,219; 5,258,494; 5,266,683; 5,284,756; 5,399,346; 및 6,593,109).

<35> 그러나, 형질전환된 CHO 세포를 이용한 재조합 hBMP2 및 hBMP7의 제조방법은 활성을 가지는 rhBMP2 및 rhBMP7을 수득하기 위하여 대량의 CHO 세포 배양을 필요로 하고, 분리·정제 단계가 복잡하며, 생산단가가 매우 높다는 문제점이 있으며, 또한 분리·정제 과정과 보관, 약제화 처리, 투약 과정 중에서 활성의 감소가 수반되는 공통적인 문제점을 가지고 있다. 이러한 동물세포 배양에 의한 재조합 BMP 류의 제조방법에 대한 단점을 일부 개선하기 위하여, 최근 Biopharm사는 rhBMP14(MP-52)를 재조합 대장균에서 제조하는 방법을 개발하여 그 제조비용을 낮춘 예가 있다 (US 2003/0181378; WO 96/33215). 그러나, 상기 rhBMP14 역시 활성을 가지는 단백질 형태로 분리·정제하는 공정이 복잡하고 불편할 뿐만 아니라, 보관, 취급 및 투약 단계에서 제조된 활성 단백질의 활성 저하 문제는 여전히 해결되지 못하였다.

<36> 또한 Biopharm사와 같이, 재조합 대장균 방식을 사용하여, 종래와 같이 활성화된 단백질을 생산할 경우에는 BMP 류의 생화학적 구조에 따라, 그 선택에 제약

이 있다. 즉, Biopharm 사의 방식으로 rhBMP14와 같은 구조의 단백질은 제조가 가능하지만, 활성화된 rhBMP2나 rhBMP4, rhBMP7 등과 같은 구조의 BMP 류를 실용적으로 제조하는 것은 곤란할 것으로 예측된다.

<37>

상업적으로 유통되며, 의학적으로 Spine Fusion 용 등으로 투약되고 있는 rhBMP-2의 경우 2005년 현재 밀리그램(mg)당 수천 US달러의 높은 가격에 판매되고 있으므로, 세계적으로 수많은 Spine Fusion 시술 필요 환자에게는 물론이며, rhBMP 류가 피부 상처 재생용, 위궤양 재생용, 간경화 해소용 등 다양한 의학적 잠재 효용 가치가 있음에도 불구하고, 높은 비용과 활성 소실에 따른 보관 취급 투약의 불편성 때문에 BMP류의 임상적인 사용이 제한을 받아왔다.

<38>

따라서, 당업계에서는 상기 rhBMP 류나 TGF- β 류와 동등 이상의 생의학적 효용성을 가지면서도 종래에 알려진 단백질에 비해 제조비용이 획기적으로 저렴하면서, 분리·정제 단계에서의 비효율적 불편성과 보관, 취급 및 투약 단계에서 불편성과 활성 저하문제를 근원적으로 해결할 수 있으며, 또한 새로운 약리 기전을 가지는 새로운 종류의 생화학 신약 물질의 개발이 절실한 상황이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<39>

이에, 본 발명자들은 기존의 활성 단백질이 가지는 문제점을 근원적으로 해결할 수 있고, 골 또는 연골 형성 촉진 및 피부 상처 재생, 궤양 치료, 간경화 등 생체 조직재생을 촉진하게 해주며, 새로운 생화학적 구조와 약리 기전을 가지는 폴리펩티드 군을 개발하기 위하여 예의 노력한 결과, 제조, 분리, 정제, 보관, 처리

등 생체내로 투약되기 전까지는 비활성 상태를 유지하다가, 생체내로 투약된 이후 생체 세포내에서 활성화되도록 하는, 새로운 약리기전에 의해, 뼈, 연골 형성 또는 재생을 촉진하거나 신장, 간, 폐, 심장 등 장기의 섬유화 및 경화를 해소시킬 수 있게 하는 새로운 종류의 폴리펩티드 군을 착안하게 되었다. 즉, 본 발명에서는 세포막을 투과하게 해주는 PTD; 하나 이상의 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD(tissue regeneration domain)를 세포 내에서 활성화시키는 FAD(furin activation domain); 및 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 활성화되어 세포내에서 조직 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 TRD를 함유하는 비활성 폴리펩티드(TRPs)를 착안하고, 상기 TRP가 rhBMP와 같은 기존의 활성 단백질에 비해, 그 제조비용이 획기적으로 낮고, 보관 및 취급이 용이할 뿐만 아니라, 투여가 매우 간단하다는 것을 확인함과 아울러, 상기 TRP가 수용체 없이 세포 내로 투과되어 세포내에서 퓨린에 의해 절단된 다음 활성화되고, 활성단백질의 다량 분비를 통해 골 형성을 촉진한다는 새로운 약리기전을 가지는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

<40> 결국, 본 발명의 주된 목적은 인체의 뼈, 연골 등 조직의 형성 재생을 촉진하거나, 신장, 간, 폐 및 심장 등 장기의 섬유화 및 경화를 해소시키고 궁극적으로는 재생을 유도하기 위해 인체에 직접 투약할 수 있도록 설계된, 종래에 알려진 활성 단백질과는 전혀 다른 구조와 특성 및 약리기전을 가지는 비활성 TRPs 및 그 제조방법을 제공하는데 있다.

<41> 본 발명의 다른 목적은 상기 비활성 TRPs를 함유하는 골, 연골 등과 같은 조

직 형성 또는 재생 촉진용 조성물 및 신장, 간, 폐, 심장과 같은 장기 섬유화 또는 경화 해소용 신약 조성물을 제공하는데 있다.

【발명의 구성】

<42> 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 세포막 수용체의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD(protein transduction domain); (b) 하나의 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD(tissue regeneration domain)를 세포 내에서 활성화시키는 FAD(furin activation domain); 및 (c) 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 활성화되어 세포내에서 조직 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 TRD를 함유하는 비활성 폴리펩티드(TRP: tissue regenerative polypeptide)를 제공한다.

<43> 본 발명은 또한, TRD를 코딩하는 DNA의 5' 앞에 FAD를 코딩하는 염기서열, PTD의 염기서열, 태깅(tagging)을 위한 염기서열 및 분리·정제를 위한 4개 이상의 히스티딘(histidine)을 코딩하는 염기서열이 삽입되어 있는 재조합벡터 및 상기 재조합벡터로 형질전환된 박테리아를 제공한다.

<44> 본 발명은 또한, 상기 형질전환된 박테리아를 배양하여 [PTD-FAD-TRD] 폴리펩티드를 발현시키는 단계; 및 (b) 상기 배양액을 원심분리한 후, 상등액과 세포 펠렛(cell pellet)에 요소용액을 가하여 상기 폴리펩티드의 2차원 및 3차원 구조를 제거하거나 1차원 선형 구조로 변형시킨 다음, [PTD-FAD-TRD] 폴리펩티드를 정제하

는 단계를 포함하는 비활성 TRP의 제조방법을 제공한다.

<45> 본 발명에 있어서, 상기 프로프로테인 컨버타제는 퓨린인 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대 PC7, PC5/6A, PC5/6B, PACE4, PC1/3, PC2, PC4 등일 수도 있다.

<46> 또한 상기 TRD는 서열번호 1 내지 13으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 세포내에서 조직 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 활성을 나타내는 단백질인 한 그 제한이 없다. 예컨대, BMPs 뿐만 아니라, TGF- β , β -NGF(β -신경성장인자), β -amyloid, ADAMs(a disintergrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs(matrix metalloproteinases), 인슐린-유사 성장인자-1(IGF-1)로 구성된 군에서 선택되는 폴리펩티드가 이에 해당한다.

<47> 상기 FAD는 서열번호 14 내지 26으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고, 세포내에서 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 상기 TRD를 활성화시키는 한, 그 제한이 없다. 또한 상기 PTD는 TAT, 초파리 유래 Antp 펩티드, VP22 펩티드 및 mph-1-btm로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 할 수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

<48> 본 발명에 따른 비활성 TRP의 제조방법에 있어서, 상기 정제단계는 상기 폴리펩티드를 니켈-티타늄 비드에 결합시키고, 이를 동일한 용액으로 세척한 다음, 이미다졸(Imidazole)과 고염도 완충용액을 사용하여 용출하는 것을 특징으로 할

수 있으나, 이에 국한되는 것은 아니다.

<49>

본 발명 따른 비활성 TRP는 종래 활성 BMP 류가 공통적으로 가지는 3차원적 입체 규칙성을 가지지 않고, 그 자체로는 생화학적 활성을 가지고 있지 않지만, 인체나 포유류 생체 내에 투약될 경우, FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단부위가 생체 세포내에 존재하는 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되면서 TRD가 활성화되고, 상기 활성화된 TRD 부분이 세포외로 분비되면서 기대하는 바의 약효를 나타내게 된다. 본 발명에 따른 TRP는 PTD와 FAD 및 TRD가 융합되어 있는 폴리펩티드 형태인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 TRP는 인체의 뼈, 연골 등 조직의 형성 또는 재생을 촉진하거나, 신장, 간, 폐, 심장 등 장기의 섬유화 및 경화를 해소시키고, 나아가 원래 조직의 재생을 유도하는 기능을 가진다.

<50>

따라서 본 발명은 또한, 상기 비활성 TRP를 유효성분으로 함유하면서, 종래에 알려진 유사 용도의 단백질 의약품과는 전혀 다른 새로운 약리 기전에 의해 조직 형성 또는 재생을 촉진하는 신약 조성물을 제공한다. 본 발명에 있어서, 상기 조직은 골 또는 연골인 것을 특징으로 할 수 있다. 본 발명은 또한, 상기 비활성 TRP를 유효성분으로 함유하는 장기의 섬유화 또는 경화 해소용 신약 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 조성물은 TRP 이외에 기타 성장인자로 TGF- β (transforming growth factor- β), IGF (insulin-like growth factor), PDGF (platelet-derived growth factor), FGF (fibroblast growth factor) 등을 적절히 포함할 수 있으며, 이 경우 치료효과를 배가시킬 수 있다.

<51> 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

<52> 본 발명에 따른 비활성 TRP는 종래에 알려진 rhBMP나 TGF- β 등과 같은 활성 단백질과는 전혀 다른 구조와 특성을 가지고 있다. 즉, 종래에 알려진 rhBMP 류와 TGF- β 류는 모두 인체나 포유류 동물 세포에 투입되기 이전에 생화학적으로 활성화되어 있으며, 도 1 및 도 2에 나타난 바와 같은 3차원 구조를 가지고 있다 (*Eur. J. Biochem.*, 237:295, 1996; *J. Mol. Biol.*, 287:103, 1999).

<53> 따라서 종래의 활성 rhBMP 류와 TGF- β 류를 제조하기 위해서는 현저하게 생산성이 낮은 CHO 등 포유류 동물세포 재조합 배양에 의존해야 하는 문제가 있다. BioPharm 사의 rhBMP14 (MP-52)와 같이, 동물세포 대신 값싼 재조합 대장균의 배양 방법으로 일부 rhBMP를 제조하고 있지만, 이 경우에도 제조하고자 하는 BMP의 생화학적 구조에 많은 제약을 받게 된다. 즉, 활성 MP-52는 재조합 대장균을 이용하여 제조할 수 있으나, 활성 rhBMP2, rhBMP4, rhBMP7 등과 같이, 뼈 또는 연골 형성 촉진과 다양한 조직 재생용으로 인체 내에 투약할 수 있는 다른 활성 BMP 류나 활성 TGF- β 류는 재조합 대장균을 통해 제조하는 것이 용이하지 않은 실정이다.

<54> 한편, US 2004/197867 A1에는 골 유도 폴리펩티드와 PTD(protein transduction domain)의 융합 폴리펩티드 및 이를 투여하여 동물에서 골 형성을 유도하는 방법을 개시하고 있다. 보다 구체적으로, 값비싼 BMP를 직접 투여하는 대신 값싼 LMP-1 (LIM mineralization protein-1)과 PTD의 융합 폴리펩티드를 투여하면, BMP2와 BMP7의 mRNA 발현이 유도된다는 내용과 함께, 골 유도 폴리펩티드로 LMP 이외에 BMP, TGF- β , SMAD 등을 함께 나열하고 있다. 하지만, 세포내에서 mRNA가 형

성된다고 해도 미세 RNA (micro RNA)를 통한 mRNA 조절 및 간섭 (interference)에 의해 수많은 mRNA로부터 단백질이 형성되지 않는다는 것이 잘 알려져 있으므로 (*Nature*, 409:363, 2001; *Cell*, 115:199, 2003), LMP-1에 의한 BMP mRNA의 증가가 골세포 분화의 결정적인 요소라는 주장은 신빙성이 부족하다. 뿐만 아니라 PTD를 이용하여 단백질을 세포내로 도입하더라도 모든 단백질이 활성화되어 기대하는 바의 약효를 나타내는 아니며 (*Curr. Protein Peptide Sci.*, 4:97, 2003), 특히 BMP 류와 같이 분비되는 단백질의 경우 세포내에 존재하면서 약효를 나타내는 단백질과는 달리 매우 복잡한 활성화 과정을 거치면서 약리 작용을 하게 된다.

<55>

특히, BMP는 LMP와 전혀 다른 약리 기전과 활성화 기전을 가지는 단백질이므로, LMP-1를 단순히 BMP로 대체할 경우, LMP-TAT에서 얻은 것과 유사한 효과를 나타낸다는 것은 실험적으로 확인하기 전에는 전혀 예측할 수가 없다. 특히 US 2004/197867과 같이 PTD를 이용하여 재조합 단백질을 세포내로 도입하였을 때, LMP-1이나 SMAD의 경우에는 활성화되어 세포 내부의 유전자 조절인자로서 기능할 가능성이 있겠지만, BMP와 TGF- β 의 경우에는 LMP 류와 달리 분비 단백질에 속하므로 세포내 활성화 과정은 LMP나 SMAD의 경우와 전혀 다를 것이다 (*Genes Dev.*, 15:2797, 2001; *J. Cell Biol.*, 144:139, 1999; *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 4:97, 2003; *Nature*, 425:577, 2003). 다시 말하자면, BMP 류와 TGF- β 류는 LMP 류와는 달리, 매우 복잡한 번역 후 과정 (intracellular processing and modification)을 거치지 않고는 기대하는 바의 뼈나 여골 형성 촉진 약효를 보일 수 없으므로, PTD를 BMP류에 단순히 결합시켜 생체에 투입한다고 해서 원하는 생물학적 기능을 발휘

할 것으로 예측할 수는 없을 것이다. 그럼에도 불구하고, US 2004/197867에는 BMP와 PTD의 융합 폴리펩티드의 도입에 의해 골 형성이 촉진된다는 실험적 근거나 언급이 없을 뿐만 아니라, BMP-PTD의 투약이 종래의 BMP 류를 투약하는 경우에 비해 어떠한 부가적 효용 가치를 가지는지에 대해서도 아무런 언급이 없다.

<56>

본 발명자들은 종래의 BMP 류를 인체나 포유류 동물 생체에 투약하는 데 있어서 일차적인 비효율성 요소가 생화학적 활성, 즉 3차원적 입체 구조에 기인한다는 점에 착안하고, 우선적으로 상온에서 3차원적 입체 규칙성 구조를 보이지 않는 비활성 폴리펩티드를 제조하고자 시도하였다. 즉, 세포막 수용체의 도움 없이 비활성 폴리펩티드를 세포내로 투과시키기 위하여, TAT와 같은 PTD에 융합시켜 세포막 투과를 확인하였다. 이러한 방법으로 3차원적 입체 구조를 가지지 않으며, 비활성 상태인 BMP를 TAT와 융합시켜 본 결과, 실시예 1에 나타낸 바와 같이, 비활성 BMP 류가 TAT 구조와 함께 세포막을 투과하여 세포내로 도입되기는 하였으나, 원하는 바의 생화학적인 활성과 뼈 또는 연골 형성 촉진과 관련되는 약리효과는 전혀 나타나지 못한다는 것을 확인하였다.

<57>

이러한 문제를 추가적으로 해결하기 위하여, 비활성 상태의 BMP를 인체 및 포유류 동물에 투여하는데 있어서, 투여되는 폴리펩티드에 세포막 투과특성을 부여함과 동시에, 세포 내에 다양하게 존재하는 퓨린과 같은 프로프로테인 컨버타제에 의해 인체 내로 투여된 비활성 폴리펩티드가 인체 내에서 활성화될 수 있게 하는 기능을 동시에 부여하는 실용적인 방안을 개발하게 되었다. 즉, 인체 등 포유류 동물 세포막 수용체(receptor)의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD와

퓨린과 같은 생체 내 프로프로테인 컨버타제에 의해 비활성 단백질을 세포 내에서 활성화시킬 수 있게 하는 FAD 및 뼈, 연골의 형성 또는 재생을 촉진하거나 신장, 간, 폐 및 심장의 섬유화 및 경화를 해소하는 등 생체 내에서 조직 성장 또는 재생을 유도하는 기능을 가지도록 활성화될 수 있는 TRD를 함유하는 폴리펩티드(TRP) 제조하고, 상기 제조된 폴리펩티드가 세포내로 투과될 뿐만 아니라, 세포내에서 활성화된 다음 분비되어, 조직 성장 촉진 혹은 재생 효과를 발휘한다는 것을 확인하였다.

<58> 본 발명에 따른 TRPs는 실용적으로 재조합 대장균과 같은 박테리아의 배양에 의해 단백질의 생화학적 구조에 제약을 받지 않으면서, 실용적으로 대량생산할 수 있고, 생체로 투여되기 전에는 생화학적으로 비활성 상태를 유지하기 때문에, 종래에 알려진 유사 용도의 활성 단백질(rhBMP 류, TGF- β 류 등)에 비해 생산비용이 수십분의 일에 불과하고, 분리, 정제 과정과 취급, 보관, 투약과정이 월등히 간단하고 편리하다.

<59> 종래 BMP 류의 제조방식에 제한이 있었던 것과 달리, 본 발명에서는 다양한 구조의 BMP 류와 TGF- β 류를 TRD로 함유하게 되는 TRPs를 재조합 대장균을 통해 실용적이고 값싸게 제조할 수 있다는 장점이 있다 (도 3). 도 3은 본 발명에 따른 TRP-1의 제조, 분리 및 정제 과정을 도시한 것이고, 도 4는 종래 rhBMP의 제조 및 분리·정제과정을 나타낸 것이다 (US 4,968,590; 5,106,626; 5,106,748; 5,166,058; 5,187,076; 5,187,623; 5,208,219; 5,258,494; 5,266,683; 5,284,756; 5,399,346; 6,593,109). 도시된 바와 같이, 형질전환된 CHO 세포배양에 의해 BMP

를 생성·분비시키고, 대규모의 배양배지로부터 herarin sepharous column 등을 이용하여 분리·정제하는 과정을 거치게 되므로, 본 발명의 방법에 비해, 분리·정제 과정이 복잡하고, 정제수율이 낮다는 문제점이 있다. 본 발명에서 제조된 TRP-1은 종래에 알려진 rhBMP-2와 달리 인체 투약 조성물 상태에서 비활성 폴리펩티드이므로, 활성 BMP를 생산하는데 수반되는 대량의 CHO 세포가 필요 없고, 분리와 정제가 단순하고, 그 정제수율이 현저히 높기 때문에, 종래에 시판되는 rhBMP-2에 비해 수십분의 일의 비용으로 생산이 가능하며, 아울러 보관 및 투약이 간편한 장점을 가지게 된다.

<60> 본 발명에서는 종래에 알려진 활성 rhBMP들이 공통적으로 가지고 있던 고비용의 문제점과, 활성 제품의 분리·정제, 보관 및 투약의 비효율적 특성을 근원적으로 해결하면서, 또한 비활성 폴리펩티드를 인체나 포유류 동물 생체에 직접 투약하여 종래에 알려진 BMP 류와는 전혀 다른 새로운 약리기전을 가지지만, 종래의 활성 rhBMP나 TGF- β 와 동등 혹은 그 이상의 조직 형성 촉진 혹은 재생 효과를 나타낸다는 것을 확인하였다.

<61> 본 발명에 따른 비활성 TRP는 종래 활성 BMP나 TGF- β 등과는 전혀 다른 약리기전을 가진다. 즉, 본 발명에 따른 비활성 TRPs를 인체 혹은 포유류 생체 내에 투여할 경우, 종래에 알려진 rhBMP류나 TGF- β 류와는 전혀 다른 약리기전에 의해 뼈 또는 연골의 형성을 촉진하거나 신장, 간, 폐, 심장의 섬유화 및 경화를 해소시킬 수 있다. 예컨대, 도 5 및 6에 도시된 바와 같이, 종래 rhBMP는 세포 고유의 수용체에 결합하고, 이를 통한 Smad 신호전달체계를 통해 골 형성 세포의 분화를 유

도하는 반면, 본 발명에 따른 TRPs는 수용체와 상관없이 세포막을 투과하고, 세포 내에서 HSP 등에 의해 재구조화된 다음, 재구조화된 TRPs가 골지복합체 등에 존재하는 푸린과 같은 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단-활성화되고, 활성화된 BMP가 세포 외부로 분비되어, 이 분비된 BMP가 스스로(autocrine), 또는 인접(paracrine) 세포 고유의 수용체에 결합하여 골 형성 세포의 분화를 유도한다.

<62> 또한, 본 발명에서는 골 형성을 유도하기 위해 시도되었던 종래의 활성 BMP를 직접 제조하여 생체내로 투입하던 방식과는 전혀 다른 치료방법을 채택하고 있다. 즉, PTD와 FAD 및 TRD가 결합된 비활성 폴리펩티드(TRP)를 재조합 박테리아에서 제조한 다음, 이를 생체 세포내로 투입하여, 상기 TRP가 세포내에서 HSP(열충격 단백질) 등에 의해 아미노산 구조가 재구성되고, 푸린(furin) 등에 의해 절단되어 활성을 가진 BMP로 전환되고, 이 활성화된 BMP가 세포 밖으로 분비됨으로써 골 형성을 유도하게 된다.

<63> 본 발명에 따른 비활성 TRP는 세포막 수용체의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD와 하나 이상의 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD를 세포 내에서 활성화시킬 수 있게 하는 FAD 및 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 세포내에서 활성화되어 조직 성장이나 형성 또는 조직재생을 촉진하는 TRD를 함유하는 폴리펩티드로, 그 자체로는 활성을 가지지 않지만, 생물체나 세포에 투과된 후, 거의 모든 세포에 다량으로 존재하는 프로프로테인 컨버타제에 의해 FAD가 절단되어, 상기 TRD가 활성화되고, 활성화된 단백질이 세포밖으로 분비되어 약효를 발휘하게 된다. 이

러한, 본 발명에 따른 TRP는 제조비용이 비싸고, 보관 및 취급이 용이하지 않고, 수용체를 반드시 필요로 하는 기존의 활성 BMP 류 단백질이 가지는 단점을 모두 해결할 수 있다.

<64> 본 발명에서는 우선, BMP 유전자의 5'부위(5' region) 앞에 퓨린 절단부위를 가지는 BMP 프로도메인의 염기서열과 PTD의 염기서열을 삽입하고, 그 앞에 태깅(tagging)을 위한 염기서열, 분리·정제를 위한 4개 이상의 히스티딘(histidine)을 코딩하는 염기서열 및 시작 염기서열인 ATG를 삽입하여 재조합백터를 제작하였다.

<65> 본 발명에 있어서, 상기 BMP 유전자로 서열번호 1의 hBMP2 또는 서열번호 6의 hBMP7를 코딩하는 유전자를 사용하였으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 또한, 상기 FAD로 서열번호 14 및 19의 hBMP2 및 hBMP7의 프로도메인을 사용하였으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대, 다른 BMP류 및 TGF- β 류의 프로도메인 등 퓨린과 같은 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 세포내에서 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 TRD를 활성화시킬 수 있는 한, 그 사용에 제한이 없다.

<66> 본 발명에서는 상기 PTD로 TAT(YGRKKRRQRRR: 서열번호 27)를 사용하였으나, 이에 국한되는 것은 아니다. 예컨대, 초파리 유래 Antp 펩티드, VP22 펩티드(Gene Therapy, 8:1, Blackbirch Press, 2001), mph-1-btm (미국특허 2005/0147971) 등과 같은 PTD를 사용할 수도 있다. 또한 상기 태깅 염기서열로 X-press의 태그(tag)를 사용하였으나, Flag, Myc, Ha, GST 등을 사용할 수도 있다.

<67> 상기 재조합백터를 제작하기 위하여, 본 발명에서는 암피실린(ampicillin) 저항성을 가지고 있으며 상업적으로 판매되고 있는 pRSET을 사용하였으나, 이에 국

한되는 것은 아니다. 예컨대, 선택적 마커로 카나마이신(kanamycin)을 가지는 박테리아 벡터, pcDNA같은 포유류 세포 발현용 벡터(mammian cell expression vector), pPGS, pBabe와 같은 바이러스 벡터를 사용할 수도 있다.

<68> 다음으로 상기 재조합벡터로 형질전환된 미생물을 배양하여 본 발명에 따른 TRP를 발현시킨 다음, 상기 발현된 TRP를 분리·정제하였다. 본 발명에서 형질전환된 대장균은 통상적으로 사용되는 배지에서 배양할 수 있고, 융합 폴리펩티드의 과발현을 유도하기 위하여 IPTG를 첨가하는 것이 바람직하다.

<69> 본 발명에서는 형질전환 미생물로 대장균(*E. coli*)을 사용하였으나, 다른 종류의 박테리아, 효모, 또는 곰팡이를 사용하는 것도 가능하며, 또한 미생물을 이용하지 않고 화학적 방법으로 유효 부위만을 합성하여 사용할 수도 있다.

<70> 상기 형질전환 미생물의 배양에 의해 발현된 융합 폴리펩티드는 GST-융합 단백질(GST-fusion protein)이나 그 외 통상의 단백질 분리·정제 방법을 사용하여 분리할 수 있다. 예컨대, 요소(urea)나 암모늄 설페이트의 농도구배를 이용하여 단백질의 침전을 유도하고, 이를 투석하여 염(salt)을 제거함으로써 본 발명에 따른 비활성 TRPs를 정제할 수 있다. 또한 본 발명에서는 과발현된 폴리펩티드의 2차원 및 3차원 구조가 필요치 않기 때문에 요소(urea)를 사용하여 2차원 및 3차원 구조의 단백질을 비활성의 1차원 선형 구조로 변경하여 사용하는 것이 바람직하다.

<71> 본 발명의 TRP를 골세포, 전구 세포, 줄기세포 등에 투여할 경우, 상기 TRP의 FAD가 퓨린과 같은 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 TRD(BMP)가 활성화된 다음, 분비되게 된다. 이 과정을 자세히 설명하자면, 세포내로 투과된 TRP는 세

포내의 F-actin에 특이적으로 결합하고, 이들은 HSP70과 같은 인자에 의해 3차원 구조를 회복하여 세포내 단백 절단효소인 푸린(furin)에 의해 푸린 절단부위가 절단되어(cleavage) TRD(BMP)가 활성화된 후, 활성화된 BMP가 세포 외부로 분비된다. 이때 세포에 투과된 본 발명의 TRP는 세포의 종류와 활성화에 따라 3-24 시간의 반감기를 가지며, 이는 투과된 단백질이 세포에 따라 다양한 활성화 시간을 갖는다는 것을 의미한다.

<72> 또한 푸린 절단부위를 돌연변이시킨 경우, 활성화된 BMP가 분비되지 않는 것으로 보아, 투과된 단백질의 세포내 공정(processing)과 활성화(activation)에 푸린 절단효소에 의한 단백질 변환(protein modification)이 결정적으로 작용한다는 것을 알 수 있었다. 한편, 생체내에서 BMP가 만들어질 때 단백질의 세포내 이동과 활성화에 중요한 역할을 하는 시그날 펩티드(signal peptide)가 존재한다. 그러나 시그날 펩티드를 삭제(deletion) 하더라도 골 형성에 있어 자연상태에 존재하는(wild type) BMP2와 유사하거나 오히려 좋은 효과를 보이는 것으로 보아, TAT를 이용한 BMP 전달에는 생체와 달리 시그날 펩티드를 필요로 하지 않는다는 것을 확인하였다.

<73> 본 발명에서 정제된 TRP를 0.1nM 이상 세포에 투여할 경우, 상기 TRP는 농도에 의존적으로 세포내로 이동하고, 세포내에서 활성화된 BMP로 전환되어, 활성화 BMP를 세포 밖으로 분비하게 된다. 본 발명의 TRP는 세포막에 존재하는 BMP 수용체의 존재와는 상관없이 1시간 이내에 대부분 세포의 세포막을 직접 투과하였으며, 세포막 투과과정은 수용체를 거치지 않는 온도-비의존적(temperature independent)이라는

것을 확인하였다. 또한 다양한 농도의 TRP를 세포에 투여하였을 때에도 세포독성(cytotoxicity)은 관찰되지 않았다.

<74>

결국, 본 발명에 따른 TRP는 BMP 등의 3차원 구조를 유지할 필요가 없고, 1차원 선형 구조 상태에서 골세포 내로 투과되어 활성 BMP 등으로 전환된 다음, 분비되는 기작을 나타낸다. 즉, 종래의 hBMP가 직접적으로 약효를 나타내는 반면, 본 발명에 따른 TRP는 간접적인 활성으로 약효(potency)를 나타내게 된다. 따라서 3차원 구조 유지를 위한 추가적인 장비나 비용이 필요 없으며, 분리·정제가 매우 용이하고, 생산공정이 간단하며 생산 단가가 낮고 의학적인 효율성이 증대되어 종래 hBMP 단백질이 가지는 문제점을 모두 해결할 수 있다. 본 발명에 따른 TRP의 특성을 종래 hBMP2 단백질과 비교하여 하기 표 1에 나타내었다. 표 1은 본 발명에 따른 비활성 TRPs 제품을 분리·정제, 보관, 투약하는 과정과 특징을 종래에 알려진 활성 rhBMP 류의 경우와 비교한 것이다.

<75>

본 발명에 따른 비활성 TRP는 뼈가 정상적으로 형성되지 않은 환경에서 뼈의 성장을 유도하거나, 외부 충격의 골절로 인한 골 손실 및 인공 관절의 고정을 촉진하는 등, 골 질환 치료용으로 유용하다. 구체적인 예로, 선천성, 외상, 또는 종양 절제, 두개 안면 기형 등의 치료, 치근막 질병의 치료 등의 치과 치료에 사용되어 골 형성 세포의 분화를 유도하고, 골 형성 세포의 성장을 자극하거나, 골 형성 세포의 분화를 유인하는 환경을 제공한다. 이외에도 본 발명에 따른 TRP는 신장이나 간과 같은 조직의 섬유화 예방 및 조직 재생을 유도하기 위해 사용될 수 있으며, 신경이나 혈관 재생과 같은 다른 용도로 사용될 수도 있다.

【표 1】

구분	종래 골 형성 단백질 (rhBMP-2 또는 rhBMP7)	본 발명의 융합 폴리펩티드 (TRPs)
생산방식	형질전환 CHO 세포배양	형질전환 대장균 배양
	형질전환된 CHO 세포를 계속 유지하면서 생산	형질전환 대장균 유지 간단
	대규모 세포 배지에서 분리 농축	대장균으로부터 직접 분리, 회석
생산단가	높음	종래보다 현저하게 낮음
생산 장비와 시설	대규모 시설과 장비가 필요	매우 단순
생산제품	활성화된 BMP2	PTD-FAD-TRD의 융합 폴리펩티드
3차원 구조	활성을 가진 고유한 3차원 구조 (도 1 및 도 2)	활성이 없는 펩티드
	자연계에 존재하는 구조	자연계에는 존재하지 않는 임의 (random) 구조
세제 및 생리 용액 용해성 (solubility)	용해성(soluble) 3차원 구조와 활성 소실	난용성(insoluble) 구조와 활성에 영향 없음
생체 투여시 운반체의 필요성	수용성 성질로 인해 매우 빠르게 확산됨 국소적 투여를 위해서는 적절한 담체나 운반체가 반드시 필요	난용성이며 인접 세포로 매우 빠른 속도로 이동 국소적 투여시 담체나 운반체에 의존적이지 않음
안정성 및 보관성	3차원 구조가 깨지면 활성소실 37℃ 이상에서 보관 불가 안정성 및 보관성이 낮음	구조와 상관없음 37℃ 이상에서 보관 가능 안정성 및 보관성 우수
생물학적 작용방식	세포막 수용체에 직접 결합 (direct action)	세포에서 활성화 단백질을 분비 (indirect action)
투여 후 단백질과 결합하는 세포내 특이 구조	해당사항 없음	F-actin
세포내 공정 과정	해당사항 없음	퓨린 효소 절단에 의해 활성화
투여시 온도 의존성	수용체 결합을 위해 생체 온도 요구	온도에 상관없이 살아있는 세포에 모두 투과
활성화 반감기	해당사항 없음	3-12시간

세포 독성	200 nM 농도에서 세포독성 없음	200 nM 농도에서 세포독성 없음
단백질 활성화 과정에서 시그널 펩티드의 역할	필수적	필요 없음
세포 선택성	반드시 BMP 수용체를 통해 신호전달	모든 종류의 세포에 수용체 없이 투과 가능
약효(potency)	유사	
투여방법	동일	

<78> 본 발명에 따른 비활성 TRP는 그 자체를 사용하거나 약제학적으로 허용이 가능한 산부가염 또는 금속 복합체, 예를 들어, 아연, 철 등과 같은 염의 형태로 사용한다. 보다 구체적으로 산부가염은 염화수소, 브롬화수소, 황산염, 인산염, 말레산염, 아세트염, 시트로산염, 벤조산염, 숙신산염, 말린산염, 아스코로브산염, 타르탈산염을 사용하는 것이 바람직하다.

<79> 본 발명에 따른 비활성 TRP를 유효성분으로 함유하는 조성물은 통상적인 투여방법, 투여형태 및 치료목적에 따라 상기 유효성분을 약제학적으로 허용가능한 부형제 또는 매트릭스인 담체와 함께 혼합하여 희석하거나, 용기 형태의 담체 내에 봉입시키는 것이 바람직하다. 또한, 다른 골 결함 치료에 유익한 다른 약제와 배합하여 사용할 수 있다. 이때, 목적하는 pH, 등장성, 안정성 등을 갖는 생리적으로 수용 가능한 단백질 조성물의 제법은 본 발명의 분야에서 따르는 통상적인 기술범위 내에 있는 것을 사용할 수 있다. 본 발명에서 상기 매트릭스는 생물접합성, 생물분해성, 기계적 특성, 미용적 외관 및 접착 특성에 따라 황산칼슘, 트리칼슘포스

페이브, 하이드록시아파티트, 폴리락트산, 포릴무수물과 같은 생물 분해성 및 화학적 물질이나; 뼈 또는 피부 콜라겐, 기타 순수 단백질 또는 세포의 매트릭스 성분과 같은 생물 분해성 및 생물학적 물질; 소결된 하이드록시아파티트, 바이오글래스, 알루미네이트 또는 기타 세라믹과 같은 비-생물 분해성 및 화학성 물질; 폴리락트산, 하이드록시아파티트, 콜라겐 및 트리칼슘포스페이트와 같은 상술한 물질의 배합물을 사용하는 것이 바람직하다. 하지만, 상기 담체로 본 발명이 제한되는 것은 아니다.

<80> 본 발명에서 부형제는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 소르비톨, 만니톨, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈 (polyvinylpyrrolidone), 마그네슘 스타아레이트, 물, 메틸하이드록시벤조에이트 (methylhydroxybenzoate), 프로필하이드록시벤조에이트(propylhydroxybenzoate), 탈크(talc), 광물유 등을 사용할 수 있다.

<81> 한편, 본 발명에 따른 비활성 TRP를 함유하는 조성물은 뼈 손상 부위에 넣기 위해 점성형으로 주사되거나 캡슐화하여 사용하는 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 사용되는 부형제나 매트릭스 등의 담체 종류와 환자의 형성된 뼈의 중량, 뼈 손상 부위, 손상된 뼈의 상태, 환자의 나이, 성별 및 다이어트, 감염의심도, 투여시간 및 기타 임상적 요인을 고려하여 조절될 수 있기 때문에 한정되지 않으나, 통상적으로 공지된 유효량은 뼈 무게를 고려하여 적정량을 연속적 또는 나누어 투여하고 뼈의 성장을 관찰하며 추가 투여를 결정할 수 있다.

<82> 이하, 본 발명을 구체적인 실시예에 의해 보다 더 상세히 설명하고자 한다.

하지만, 본 발명은 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 사상과 범위 내에서 여러가지 변형 또는 수정할 수 있음은 이 분야에서 당업자에게 명백한 것이다.

<83> 특히 하기 실시예에서는 TRP를 구성하는 TRD로 hBMP2 및 hBMP7 만을 예시하였으나, hBMP3, hBMP4, hBMP6, hBMP14 (MP-52)와 같은 인간 유래 BMP 뿐만 아니라, 쥐, 소, 돼지 등과 같은 포유류 및 그 외 고등동물 유래 BMP도 사용할 수 있다는 것은 당업자에게 자명하다 할 것이다. BMPs 이외에도 TGF- β , β -NGF(β -신경성장인자), β -amyloid, ADAMs (a disintergrin and metalloproteinase-like), ectodysplasin-A(Eda-1)와 같은 TNF- α 군, MT1-MMP(membrane type-matrix metalloproteinase)와 MMP-2를 포함하는 MMPs군, 인슐린-유사 성장인자-1(IGF-1) 등과 같은 폴리펩티드를 사용하는 것도 가능하다는 것 역시 당업자에게 자명하다 할 것이다.

<84> 또한 하기 실시예에서는 TRP를 구성하는 FAD로 BMP의 프로도메인 만을 예시하였으나, 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고, 세포내에서 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 TRD를 활성화 시키는 한, 그 제한이 없다는 것도 당업자에 자명하다 할 것이다.

<85> 실시예 1: [TAT-hBMP2] 융합 폴리펩티드의 제조

<86> BMP/TGF- β 군 단백질은 하나의 disulfide bond에 의해 두개의 동일한 펩티드가 서로 연결된 dimer로 구성된다. 이때 각각의 펩티드는 BMP의 종류에 따라

120-140개의 아미노산으로 구성되고, 각 BMPs 내부에 존재하는 7개의 시스테인 단말기중 하나가 다른 펩티드의 동일 부위와 disulfide bond를 형성함으로써 dimer를 구성하게 되며, 나머지 6개의 시스테인은 동일 아미노산내에서 3개의 disulfide bond를 형성하여 (intrachain disulfide bond) 독특한 3차원 구조를 가지게 된다 (Proc. Natl. Acad. Sci., 93:878, 1996; J. Bone Joint Surg., 83:S1, 2001). 이때, BMP2의 경우 114개의 아미노산, BMP7은 139개의 아미노산, TGF- β 2와 β 3는 112개의 아미노산으로 구성된다. 도 1은 이들의 아미노산 배열과 3차원 구조 모식도를 나타낸 것이고, 도 2는 이미 공지된 BMP2의 3차원 구조를 나타낸 것이다 (Eur. J. Biochem., 237:295, 1996; J. Mol. Biol., 287:103, 1999), BMP/TGF- β 의 내부의 7개의 시스테인의 위치가 모두 보존되어 있는 것으로 보아 시스테인이 3차원 구조에 중요한 역할을 한다는 것을 알 수 있다.

<87> 그러므로 종래에 알려진 hBMP2에 PTD를 결합시켜 융합단백질을 제조하고, 이를 세포내로 투입할 경우, 이미 잘 알려진 바와 같이, 이 융합단백질은 세포막 수용체의 도움 없이도 세포막을 투과하여, HSPs (heat shock protein)등에 의해 생물학적 활성을 가진 단백질로 전환(refolding)될 것으로 기대할 수 있다 (Nature Med., 4:1449, 1998; Science, 285:1569, 1999).

<88> 따라서 본 실시예에서는 서열번호 28과 29의 프라이머를 이용하여 Saos-2 세포(American Type Culture Collection, ATCC HTB-85)의 mRNA를 주형으로 사용한 RT-PCR에 의해 서열번호 1의 아미노산 서열을 가지는 hBMP2를 코딩하는 유전자를 증폭하였다. 박테리아 발현벡터에 cloning하기 위하여, 각 프라이머의 5'에 제한효

소 *Kpn* I 부위(5'-ggtagc-3')를 추가하였고, 이하 실시예에서도 cloning을 위한 프라이머는 모두 제한효소 *Kpn* I 부위를 추가하여 이용하였다.

<89> 서열번호 28: 5'-caa gcc aaa cac aaa cag cgg aaa-3'

<90> 서열번호 29: 5'-ttt gct gta cta gcg aca ccc aca-3'

<91> 상기 증폭된 hBMP2 유전자를 TA cloning vector (Invitrogen, Inc)에 삽입하고, GenBank의 염기서열 (NCBI, NM_001200)과 비교하여 전술한 114 아미노산이 모두 포함된 것을 확인하였다. 상기 클로닝된 hBMP2 유전자를 pRSET 박테리아 발현벡터(bacterial expression vector, Invitrogen, Inc)의 *Kpn*I sites에 다시 클로닝하고, 상기 hBMP2 유전자의 5' (5'region)앞에 TAT (YGRKKRRQRRR: 서열번호 27) 염기서열을 삽입한 다음, 그 앞에 X-press(Invitrogen, Inc) 태그(tag)와, 분리·정제를 위한 6개의 히스티딘(histidine)을 코딩하는 염기서열과 시작 염기서열인 ATG를 삽입하여 BMP2의 발현을 위한 재조합 발현벡터(expression vector)를 제작하였다(도 7). 이때, TAT이 삽입되지 않는 벡터를 음성대조군(negative control)으로 사용하였다.

<92> 상기 제작된 재조합벡터를 열 충격(heat shock) 방법으로 대장균 BL21 (*E. coli* BL21; Invitrogen Inc.)에 도입한 다음, 37℃에서 2~3시간 배양한 후 IPTG(isopropylthio-galactoside) 1 mM을 첨가하고 2~18 시간동안 추가 배양하여 TAT-BMP2의 발현을 유도하였다.

<93> 상기 배양물에서 대장균을 원심분리하고, 상층액과 펠렛(cell pellet)에 8M의 요소 용액을 첨가하여 BMP의 2차원 및 3차원 구조를 제거한 다음, 니켈-티타늄

비드(Ni-Ti beads, Qiagen)를 첨가하여 TAT-BMP2를 비드에 결합시킨 후, 이를 동일한 용액으로 3회 세척하고, 이미다졸 (Imidazole)과 고염도 완충용액(high salt buffer)을 사용하여 용출하여 정제된 TAT-BMP2를 수득하였다.

<94> 도 8은 형질전환된 대장균 BL21의 배양시 IPTG로 단백질 발현을 유도하기 이전과 이후의 전체 단백질을 전기영동으로 확인한 것이다. 여기서, 화살표는 IPTG에 의해 유도된 TAT-BMP 융합단백질을 나타내고, 레인 1은 유도되지 않은 TAT-BMP2(uninduced TAT-BMP2), 레인 2는 IPTG에 유도된 TAT-BMP2, 레인 3은 유도되지 않은 BMP2(w/o TAT), 레인 4는 IPTG에 유도된 BMP2(w/o TAT)를 나타낸다. 도시된 바와 같이, IPTG 첨가에 의해 융합단백질 생성을 유도한 경우, 대조군에 비해 TAT-BMP2 융합 단백질이 더 많이 생성된 것을 확인할 수 있었다.

<95> 도 9는 상기 정제된 TAT-BMP2와 BMP2(w/o TAT)를 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용한 웨스턴 블랏(western blot)을 통해 확인한 것이다. 여기서, 레인 1은 TAT-BMP2, 레인 2는 BMP2(w/o TAT)를 나타낸다. 도시된 바와 같이, TAT가 부가된 경우(~20kDa), 부가되지 않은 경우(~18kDa)에 비해, 분자량이 약간 증가하는 것을 알 수 있었으며, 상기 결과로부터 TAT-hBMP2 융합 폴리펩티드가 성공적으로 제조된 것을 확인할 수 있었다.

<96> 상기 제조된 TAT-BMP2가 세포내로 투과되는지를 확인하기 위하여, 1차 배양된 잇몸 섬유세포 (gingival fibroblast)에 TAT-BMP2를 4 nM의 농도로 2시간 처리한 다음, 세포를 수득하여 항 X-press 일차 항체 (Invitrogen, Inc)를 이용하여 웨스턴 블랏을 수행하였다. 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, TAT-BMP2는 2시간

이내에 대부분 세포 내부로 투과된 것을 알 수 있었고, TAT가 없는 경우에는 세포 내부로 투과되지 않았다. 레인 1은 TAT가 없는 BMP2 4 nM를 2시간 처리한 것이고, 레인 2부터 6까지는 같은 농도의 TAT-BMP2를 각각 0시간, 15분, 30분, 1시간, 2시간 처리하여 세포에 존재하는 TAT-BMP2의 발현을 항 X-press 항체를 이용하여 웨스턴 블랏한 것이다. 레인 7은 웨스턴 블랏 양성 대조군으로 TAT-BMP2를 10 ng 사용하였다.

<97>

세포내로 도입된 TAT-BMP2가 생물학적 활성을 가지는 BMP2로 변화되고 이들이 골세포 분화를 유도하는지 알아보기 위하여, 동일한 세포에 2 nM의 TAT-BMP2를 48시간 간격으로 투여하고, 1주일 후에 alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정하였고, 2주간 배양하여 von Kossa 염색을 시행하여 석회화 물질 형성을 관찰하였다. 이때 TAT가 없는 BMP2를 음성 대조군으로 사용하였고, 시판중인 rhBMP-2를 양성 대조군으로 사용하였다. 도 11은 ALP 활성도를 나타낸 것으로, 음성 대조군 (N/C)은 1차 배양된 섬유모 세포에 배지만 1주일 처리한 것이고, rhBMP-2는 시판중인 BMP2를 2 nM의 농도로 1주일간 처리한 것이며, TAT-BMP-2는 본 실시에에 따른 TAT-BMP-2를 2 nM의 농도로 1주일간 처리한 것이고, TAT(-)BMP-2는 TAT-BMP-2에서 TAT를 삭제한 것이다. 도 12는 von Kossa 염색으로 석회화 물질의 침착을 관찰한 것이다. 도 11 및 도 12에 나타난 바와 같이, 시판되는 rhBMP-2와 달리, 본 실시에에 따른 TAT-hBMP-2는 생물학적 활성을 가지지 않음을 알 수 있었다.

<98> 실시예 2: [TAT-FAD-hBMP2] 융합 폴리펩티드(TRP-1)의 제조

<99>

실시에 1에서 기술한 바와 같이, hBMP2는 disulfide bond 결합에 의해 고유한 내부 3차원 구조와 dimer를 형성함으로써 생물학적 활성을 가진다. 그러나 실시에 1에서 살펴본 바와 같이, TAT와 hBMP2가 융합된 단백질은 성공적으로 세포내로 투과됨에도 불구하고, 생물학적 활성, 즉 골 세포 분화를 유도하지 못한다는 것을 알 수 있었다. 이는 분비되어 생물학적 활성을 가지는 단백질의 경우, 종래 PTD와 융합된 단백질(*Trends Cell Biol.*, 10:290, 2000; *Curr. Prot. Pept. Sci.*, 4:97, 2003)과는 달리, HSPs 등에 의한 아미노산의 재구조화 (restructuring) 만으로는 활성을 나타내는데 충분하지 않다는 것을 의미한다.

<100>

BMPs와 TGF- β 는 세포내의 리보솜 (ribosome)에서 생합성될 때, 400개 이상의 아미노산으로 구성된 전구체(precursor) 형태로 존재한다. 합성된 아미노산은 N-terminal 부분에 존재하는 시그널 펩티드(signal peptide)에 의해 골지체 (Golgi complex), 내구체 (endosome) 등으로 이동하고, 이들은 다시 푸린과 같은 프로프로테인 컨버타제(proprotein convertase)에 의해 절단(cleavage) 및 활성화되어 세포 밖으로 분비된다 (*Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002; *J. Cell Biol.*, 144:139, 1999). 상기 골지체 등에서 번역후 변형 내지 활성화 과정 (post-translational modification)을 거치는데, 이때 아미노 단말(N-terminal) 부위에 위치한 시그널 펩티드와 프로도메인(prodomain)이 결정적인 역할을 한다 (*Mol. Biol. Cell*, 15:5012, 2004). 이 과정에서 BMP 전구체는 다른 분비 단백질과 유사하게 푸린 절단부위(-RSKR-)가 푸린(furin)에 의해 절단되어 성숙 BMP 부분으로 활성화된 다음 분비된다 (Constam, D.B. & Robertson, E.J., *J. Cell Biol.*,

144:139, 1999; Cui, Y. *et al.*, *Genes & Development*, 15:2797, 2001). 그러나, 상기 논문에는 BMP 전구체의 세포내 투여방법에 대한 아무런 언급이 없을 뿐만 아니라, 특히 PTD와 융합된 형태로 BMP 전구체를 세포내에 도입시키는 것에 대한 것은 시사된 바도 없다.

<101>

퓨린과 같은 프로프로테인 컨버타제(proprotein convertase)로는 PC7, PC5/6A, PC5/6B, PACE4, PC1/3, PC2, PC4 등이 알려져 있다 (*Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002). 이들은 대부분의 세포내 소기관, 특히 골지복합체(Golgi network), 소구체(endosomes), 분비과립(secretory granule)에 풍부하게 존재하며, 다양한 단백질의 활성화 및 분비뿐만 아니라, 여러 감염성 질환의 활성화에도 중요한 역할을 수행한다 (*Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002). 퓨린과 같은 프로프로테인 컨버타제에 의해 활성화되는 사람 생체 단백질로는 BMPs/TGF- β 외에 β -NGF(β -신경성장인자, β -nerve growth factor), β -amyloid, ADAMs (a disintegrin and metalloproteinase-like), ectodysplasin-A(Eda-1)와 같은 TNF- α 군, MT1-MMP(membrane type-matrix metalloproteinase)와 MMP-2를 포함하는 MMPs군, IGF-1 등이 있다 (*Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 3:753, 2002).

<102>

특히 BMPs는 세포내에서 자연 생합성될 경우, BMPs 전구체의 prodomain에 존재하는 한개 내지 두개의 퓨린 절단부위가 BMPs의 활성화에 기여하는 것으로 알려져 있다 (*J. Cell Biol.*, 144:139, 1999; *Genes Dev.*, 15:2797, 2001). 사람 BMP2의 경우, 프로도메인 내부에 1~2개의 퓨린 절단부위 (RXKR, R=Arg, K=Lys, X=basic 아미노산을 제외한 다른 아미노산)가 존재하며, PTD-BMP2 융합단백질의 활성화와

분비에 이들이 중요한 역할을 할 것으로 추론하였다. 이를 확인하기 위하여, 본 실시예에서는 실시예 1의 TAT-hBMP2에 서열번호 14의 아미노산 서열을 가지는 퓨린 절단부위 함유 FAD를 추가하여 TAT-FAD-hBMP2의 구조를 가지는 폴리펩티드를 제조하였다.

<103> 우선 상기 FAD를 코딩하는 염기서열을 추가하기 위하여, 서열번호 30과 31의 프라이머를 사용하여 서열번호 1의 hBMP2를 코딩하는 염기서열과 서열번호 14의 아미노산 서열을 가지는 FAD를 코딩하는 염기서열을 모두 가지는 DNA를 실시예 1과 같은 방법으로 증폭하였다. 상기 증폭된 DNA의 염기서열을 확인한 다음, 실시예 1과 같은 방법으로 박테리아 발현벡터에 cloning 하였다.

<104> 서열번호 30: 5'-gag ttt ttc cat gtg gac gct ctt-3'

<105> 서열번호 31: 5'-ttt gct gta cta gcg aca ccc aca-3'

<106> 상기 형질전환된 대장균을 실시예 1과 같은 방법으로 배양 및 정제하여 TAT-FAD-hBMP2(TRP-1)을 수득하였다. 즉, 배양물에서 TRP-1이 생성된 대장균을 원심분리한 다음, 상층액과 펠렛(cell pellet)에 8M의 요소 용액을 첨가하여 BMP2의 2차원 및 3차원 구조를 제거하고, 니켈-티타늄 비드(Ni-Ti beads, Qiagen)를 첨가하여 TRP-1을 비드에 결합시킨 후, 이를 동일한 용액으로 3회 세척하고 이미다졸(Imidazole)과 고염도 완충용액(high salt buffer)을 사용하여 용출하여 정제된 TRP-1을 수득하였다 (도 3).

<107> 한편, 시그날 펩티드와 프로도메인, 퓨린 절단부위의 중요성을 확인하기 위하여, 상기 제작된 발현벡터를 주형으로 하고, 각각 서열번호 32와 33 (Δ Sig), 서

열번호 34와 35 (Δ Pro), 서열번호 36과 37 (R283A)의 프라이머를 이용하여 각각의 삭제 (deletion), 또는 돌연변이 벡터를 제작하였다. 그 모식도는 도 13에 나타내었다.

<108> 서열번호 32: 5'-tcc acc atg gcc ggt acc ctc gtt ccg gag ctg ggc-3'

<109> 서열번호 33: 5'-gcc cag ctc cgg aac gag ggt acc ggc cat ggt gga-3'

<110> 서열번호 34: 5'-tcc acc atg gcc ggt acc gat gga aaa ggg cat cct-3'

<111> 서열번호 35: 5'-agg atg ccc ttt tcc atc ggt acc ggc cat ggt gga-3'

<112> 서열번호 36: 5'-ctc cac aaa aga gaa aaa gct caa gcc aaa cac aaa cag-3'

<113> 서열번호 37: 5'-ctg ttt gtg ttt ggc ttg agc ttt ttc tct ttt gtg gag-3'

<114> 상기 제작된 각각의 발현벡터로 대장균을 형질전환시킨 다음, TRP-1과 동일한 배양·정제과정을 거쳐 다양한 TRP-1 변이체를 수득하였다. 도 13에서, TRP-1은 TAT-hBMP2에 FAD를 추가한 본 실시예에 따른 TAT-FAD-hBMP2를 나타내고, Δ (Sig)는 TAT-FAD-hBMP2에서 시그널 펩티드 (signal peptide, 서열번호 14의 아미노산 1-24) 부위를 삭제한 것이며, Δ (FAD)는 TAT-FAD-hBMP2에서 TAT-hBMP2와 두 번째 퓨린 절단부위만을 가지도록 N-terminal 부위의 FAD(서열번호 14의 아미노산 1- 269)를 삭제한 것이고, R283A는 TAT-FAD-hBMP2에서 두 번째 퓨린 절단부위의 Arg을 Ala로 돌연변이시킨 것을 나타낸다. 각 발현벡터의 N-terminal쪽에는 실시예 1과 같이 TAT domain, X-press tag 등이 포함되어 있고, 각 벡터의 제작 후에 염기서열을 확인하였다.

<115> 다음으로, 상기 제조된 TRP-1 및 그 변이체를 각각 같은 세포에 투여하였다.

즉, 각 재조합 단백질을 1차 배양된 섬유세포에 2 nM로 2시간 처리한 다음, 세포를 수득하여 항 X-press 항체로 웨스턴 블랏하였다 (도 14). 그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, TRP-1 및 그 변이체가 모두 세포내로 투과되어 발현되는 것을 확인할 수 있었다.

<116> 실시예 3: 프로프로테인 컨버타제에 의한 TRP-1의 절단과 활성화

<117> 본 발명에 따른 비활성 TRP-1이 퓨린에 의해 절단되고 세포내에서 활성화되는 지를 알아보기 위하여, 실시예 2에서 제조된 TRP-1을 재조합 퓨린 단백질 (Sigma, 미국)을 이용하여 시험관에서 절단하였다. 그 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, TRP-1은 시험관에서 퓨린에 의해 성공적으로 절단되는 것을 알 수 있었다.

<118> 또한 본 발명에 따른 비활성 TRP-1이 세포내에서 퓨린에 의한 활성화되는지를 확인하기 위하여, 퓨린 억제 단백질인 $\alpha 1$ -PDX ($\alpha 1$ antitrypsin Portland) (*Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95:7293, 1998) 발현백터를 이용하여 세포내 퓨린을 억제하였다. 본 발명에 따른 비활성 TRP-1은 세포내로 도입된 이후 생물학적 활성을 가지는 단백질로 전환되므로, TRP-1 투여후 일정시간이 지나면 세포 내부에 초기에 도입된 TRP-1이 점차 감소하게 된다. 따라서 $\alpha 1$ -PDX 발현을 유도하여 퓨린을 억제 한 경우 잔존 TRP의 양이 증가할 것으로 예상할 수 있다.

<119> 그 결과, 도 16에 도시된 바와 같이, 본 발명의 TRP-1은 $\alpha 1$ -PDX 발현 (퓨린 효소 억제)에 의해 반감기가 증가하였다. 즉, 본 발명의 TRP-1을 투여한 경우, 4시간 후(별표) 대조군에 비해, $\alpha 1$ -PDX 투여군에서 반감기가 증가하였다. 이 결과로

부터, 세포내로 투여된 TRP-1이 퓨린 효소에 의해 절단 및 활성화된다는 것을 확인할 수 있었다.

<120> 실시예 4: TRP-1의 활성화시 FAD의 중요성

<121> 실시예 2와 3을 통해 TRP-1이 세포내에서 퓨린에 의해 절단되고 활성화된다는 것을 확인하였다. 따라서 TRP-1이 세포내로 투입된 후 생물학적 활성을 나타내는 데는 FAD와 퓨린 절단부위가 중요한 역할을 수행할 것으로 예상할 수 있다. 이를 확인하기 위하여, 실시예 2에서 수득한 TRP-1 및 그 변이체를 1차 배양한 섬유세포에 투여하고, ALP 활성화와 석회화 물질의 침착을 관찰하였다 (도 17). TRP-1 및 그 변이체에 대하여, 실시예 1과 같은 방법으로 alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정한 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, TRP-1(TAT-FAD-hBMP2)은 높은 ALP 활성을 나타냈으며, 시그날 펩티드가 삭제된 TRP-1 변이체[Δ (Sig)]에서도 TRP-1과 유사하거나 오히려 더 높은 활성을 나타냈다. 이 결과는 TAT와 FAD를 이용한 BMP2의 활성화에 시그날펩티드가 필수적이지 않음을 보여주는 것이다. 하지만 TAT-hBMP2에 두 번째 퓨린 활성화 부위만을 포함하는 변이체[Δ (FAD)] 및 TRP-1의 퓨린 절단부위 일부를 돌연변이킨 변이체(R283A)의 경우에는 생물학적 활성이 없다는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 전술한 방법으로 TRP-1 및 그 변이체를 각각 2주간 처리하고 von Kossa 염색하여 석회화 물질의 침착을 관찰한 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 상기 ALP 활성화도 결과와 유사한 결과를 나타냈다. 여기서 rhBMP-2는 시판 중인 rhBMP-2를 같은 농도로 처리하여 양성 대조군으로 사용한 것이고, 아무것도

처리하지 않고 배지만 사용한 것을 (N/C) 음성 대조군으로 사용하였다. 이러한 결과는 TAT-FAD-hBMP2 재조합 단백질이 세포내로 투입되어 생물학적 활성을 갖도록 하기 위해서는 자연 생합성되는 hBMP-2 또는 rhBMP-2 경우와 달리, 리보솜 (ribosomes)에서 골지복합체 (Golgi network)로의 이동과정은 필요 없지만, 퓨린 절단부위를 온전하고 정확하게 가지고 있어야 한다는 것을 의미한다.

<122> 본 실시예를 통해 본 발명의 TAT-FAD-hBMP2 융합 폴리펩티드는 PTD, FAD, TRD(본 실시예에서는 hBMP2)의 3 도메인으로 구성되는 폴리펩티드 중 어느 한 도메인이 없거나 결함이 있을 경우, 인체에 투입하여도 원하는 약리효과를 발휘할 수 없다는 것을 확인하였다. 이러한 TRP-1의 약리작용에 대한 기전해석(도 6)이 완전한 것은 아닐 수 있으나, 뼈, 연골, 혹은 다양한 종류의 조직재생을 목적으로 비활성 상태의 BMP 류 혹은 TGF- β 류의 폴리펩티드를 인체에 투여하는 경우, 본 발명에 따른 TRP-1이 종래에 알려진 제품들에 비해 매우 유용한 약리효과와 혁신적인 상업적 가치를 보일 것으로 기대된다. 즉, TAT-FAD-rhBMP-2는 종래에 알려진 BMP 류 혹은 TGF- β 류와 전혀 다른 새로운 약리작용 개념 하에 설계되었으며, 새로운 방법으로 제조되었는 바, 이를 TRP-1로 명명하였다.

<123> 실시예 5: TRP-2[TAT-FAD-BMP7]의 제조

<124> 실시예 4에서 나타낸 바와 같이, BMPs 및 TGF- β 와 같은 분비 단백질이 PTD와 융합될 경우, 전체 길이를 가지는 것만으로는 충분하지 않으며, 생체에서 생합성될 때, 형성되는 전구체 (precursor)의 퓨린 절단 및 활성화 부위를 충분히 가지

고 있어야 한다. 사람의 BMP7은 골 및 연골세포 분화를 촉진하고, 최근에는 같은 유전자군인 TGF- β 의 길항제 (antagoist)로 작용하여 신장, 간, 폐, 심장의 섬유화 및 경화를 억제하는 것으로 알려져 있다 (*Nature Med.*, 9:964, 2003; *J. Clin. Invest.*, 112:1776, 2003).

<125> 본 실시예에서는 서열번호 38과 39의 프라이머를 이용하여, 서열번호 19의 FAD 및 서열번호 6의 hBMP7을 포함하는 아미노산 서열을 코딩하는 염기서열을 실시예 2와 같은 방법으로 증폭하였다. 상기 증폭물의 염기서열을 GenBank에서 확인 (NCBI, NM_001719)하고, 실시예 2와 같은 방법으로 박테리아 발현벡터에 cloning하여 재조합 폴리펩티드를 제조하고, 이를 TRP-2라 명명하였다.

<126> 서열번호 38: 5'-ggc gcg atg cac gtg cgc tc ctg -3'

<127> 서열번호 39: 5'-agg gtc tga att ctc gga gga gct -3'

<128> 도 19는 형질전환된 대장균 BL21의 배양시 IPTG로 단백질 발현을 유도하기 이전과 이후의 전체 단백질을 전기영동으로 확인한 것이다. 여기서, 화살표는 IPTG에 의해 유도된 TRP 융합 단백질을 나타내고, 레인 1은 유도되지 않은 TRP-1(uninduced TRP-1), 레인 2는 IPTG에 유도된 TRP-1, 레인 3은 유도되지 않은 TRP-1(w/o TAT), 레인 4는 IPTG에 유도된 TRP-1(w/o TAT), 레인 5는 유도되지 않은 TRP-2(w/o TAT), 레인 6은 유도된 TRP-2(w/o TAT), 레인 7은 유도되지 않은 TRP-2 및 레인 8은 IPTG로 유도된 TRP-2를 나타낸 것이다. 도시된 바와 같이, IPTG 첨가에 의해 융합단백질 생성을 유도한 경우, 대조군에 비해 TRPs가 더 많이 생성되었다.

<129> 도 20은 상기 정제된 TRPs를 항 X-press 항체(anti-X-press antibody)를 이용한 웨스턴 블랏(western blot)을 통해 확인한 것이다. 여기서, 레인 1은 TRP-1, 레인 2는 TRP-1(w/o TAT), 레인 3은 TRP-2(w/o TAT) 및 레인 4는 TRP-2를 나타낸다. 도시된 바와 같이, TAT가 부가된 경우, 부가되지 않은 경우에 비해 분자량이 약간 증가하는 것을 나타냈으며, 이로부터 TRPs 융합 폴리펩티드가 성공적으로 제조된 것을 확인할 수 있었다.

<130> 실시예 6: TRP-1과 TRP-2의 세포내 도입

<131> 본 실시예에서는 먼저 1차 배양된 잇몸의 섬유아세포(gingival fibroblasts)에 실시예 2와 5에서 정제된 TRP-1 및 TRP-2를 4nM 처리하고 세포와 배지에 각각 존재하는 TRP-1 및 TRP-2의 발현정도를 비교하여 세포내 도입 여부를 알아보았다.

<132> 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, TRP-1은 세포막을 투과하여 세포내로 이동하였다. 즉, 1차 배양된 잇몸의 섬유아세포에 4 nM의 TRP-1을 처리하고 세포와 배지에 각각 존재하는 TRP-1의 발현정도를 웨스턴 블랏한 결과, TRP-1은 1시간 이내에 대부분 세포내로 이동하였고, 6시간 이후에는 배지에 거의 남아 있지 않았다. 그러나 TAT가 없는 대조군의 경우에는 세포내로 전혀 들어가지 않았다. 또한, 같은 방법으로 TRP-2를 세포에 투여한 결과, 도 22에 나타난 바와 같이, TRP-2 역시 2시간 이내에 세포막을 투과하여 세포 내부로 이동하였으나, TAT가 없는 대조군의 경우에는 세포내로 전혀 들어가지 않았다.

<133> 실시예 7: TRPs에 의한 활성화 BMP의 분비와 PTD의 중요성

<134> 본 실시예에서는 TRPs가 세포 내로 도입된 경우, 상기 세포에서 활성화된 BMP가 분비되는지 여부를 확인하고자, TRP-1을 세포 내에 도입시키고, 48시간 이내에 활성화 BMP2의 분비여부를 측정하였다. 그 결과, 도 23에 나타난 바와 같이, 세포내로 들어간 TRP-1은 48시간 내에 활성화된 BMP2를 분비한다는 것을 알 수 있었다. 이때, 양성대조군으로 시판되는 활성화 BMP2인 rhBMP-2를 사용하였다.

<135> 또한, 본 발명의 TRP-1을 세포내로 도입시키고, 1차 배양된 섬유아세포의 골세포 분화와 석회화 물질의 형성여부를 확인을 통해, 골세포 분화 및 골 재생효과를 알아보았다. 섬유아세포를 1주일간 배양하면서 rhBMP-2와 TRP-1을 각각 2 nM의 농도로 2주간 처리하고, 1주일 후 폰 코사(von Kossa) 염색처리하여 육안으로 관찰한 결과, 도 24에 나타난 바와 같이, 세포 배지만 사용한 음성 대조군(N/C)과 TAT가 없는 TRP-1 [TRP-1(TAT-)]의 경우 골세포 분화와 석회화 물질의 형성을 관찰할 수 없었으나, TRP-1과 시판중인 rhBMP-2의 경우에는 섬유세포내에서 골세포 분화와 석회화 물질의 형성을 확인할 수 있었다.

<136> 아울러, 같은 방법으로 섬유아세포를 1주일간 처리하고 골세포 분화 표지자로 사용되는 alkaline phosphatase (ALP) 활성도를 측정한 결과, 도 25에 도시된 바와 같이, 본 발명의 TRP-1과 시판되는 rhBMP-2가 유사한 정도의 ALP 유도효과를 나타냈다.

<137> 한편, 시판되는 활성화 BMP2(rhBMP-2)와 본 발명의 TRP-1의 역할을 비교하기 위하여, 1차 배양된 섬유아세포를 1주일간 배양하고 각각 TRP-1 및 rhBMP-2로 처리

한 다음, 폰 코사 염색처리하여 육안으로 관찰하였다. 그 결과, 도 26에 나타난 바와 같이, 본 발명의 TRP-1과 시판되는 활성 rhBMP-2는 유사한 약효(potency)를 나타내는 것으로 확인할 수 있었다. 구체적으로는 0.5 nM 이상의 농도에서는 시판되는 rhBMP-2와 본 발명에 따른 TRP-1의 역가가 유사하였다.

<138> 실시예 8: 세포막 투과후 TRPs의 활성화 반감기

<139> 본 실시예에서는 세포내에 투과되어 들어간 TRPs가 HSPs 등에 의한 단백질 재배열과 퓨린에 의한 활성화 과정을 거쳐, 활성 BMP로 분비된다는 것을 확인하기 위하여, 투여된 단백질의 활성화 과정 반감기를 알아보았다. 이를 위해 퓨린 활성이 높은 293 세포주(ATCC CRL-1573)에 본 발명에 따른 TRP-1을 투여한 다음, 실시예 6과 같은 방법으로 처리하고, TRP-1의 발현정도를 시간별로 웨스턴 블랏하였다.

<140> 그 결과, 도 27에 도시된 바와 같이, 세포에 투여된 TRP-1은 293 세포에서 3-4시간의 반감기를 가지고 있었다. 이러한 반감기는 세포마다 다르게 나타났으며, osteogenic sarcoma 세포주에서는 약 6시간, 1차 배양된 섬유세포에서는 약 8시간이었다. 이 결과로부터 본 발명에 따른 TRPs는 세포내에서 HSPs, 퓨린 등에 의한 활성화 과정을 거쳐 활성 BMP로 분비된다는 것을 확인할 수 있었다.

<141> 실시예 9: TRPs의 세포막 투과와 투과시 온도의 영향

<142> 시판중인 재조합 rhBMP는 세포막에 존재하는 수용체를 통하지만, 본 발명의 TRPs는 세포막을 직접 투과하며, 종래 rhBMP-2의 수용체를 통한 과정은 온도에 의

존적이다. 본 발명에 따른 TRPs의 세포내 투과가 온도 의존적인지 여부를 확인하기 위하여, TRP-1과 TRP-2를 다양한 온도에서 세포에 적용하고, 다양한 시간에 공초점 형광현미경(confocal fluorescent microscope)으로 관찰하였다. 이때 본 발명의 TRP-1 또는 TRP-2를 10 nM의 일정한 농도 하에, 도 28에 나타난 조건과 같이, 다양한 온도와 시간별로 처리하였다. 투과된 TRPs를 1차 항체로 anti-X-press 항체 (Invitrogen), 2차 항체로 Alexa-Fluoro-488 (Invitrogen)을 반응시키고 핵의 염색을 위해 Far-Red TOTO-3 (Molecular Probes)을 사용하였다. 도 28에서 제일 윗 사진은 TRP-1이 37°C에서 세포질내로 들어간 것을 나타낸 것이고, Merge는 동일 단면의 TRP-1과 세포 핵 영상을 중첩한 것이다. 또한 중간 사진은 TRP-1을 5분간, TRP-2를 5 및 60분간 처리하고 전술한 방법으로 중첩한 이미지를 나타낸 것이다. 가장 아래 사진은 TRP-1과 TRP-2를 4°C에서 60분간 처리하고, 세포내로 도입된 TRP-1과 TRP-2의 중첩 이미지를 나타낸 것이다.

<143>

그 결과, 도 28에 도시된 바와 같이, TRP-1은 37°C에서 투여후 5분 이내에 세포내로 투과되어 들어갔고, 1시간 정도 경과 후에 TRP-1과 TRP-2는 일부 핵에도 있었지만 대부분 세포질 내에 존재하였다. 아울러 25°C와 4°C에서도 37°C에서와 유사한 투과 양상을 나타냈다. 이 결과로부터, 본 발명에 따른 TRPs의 세포막 투과는 온도에 비의존적이라는 것을 알 수 있었다.

<144> 실시예 10: 세포내로 도입된 TRPs와 F-actin의 특이적인 결합여부

<145> 상술한 바와 같이, 세포내로 투과된 본 발명에 따른 TRPs는 세포내에서 선형 (linear)의 특정 패턴을 가지고 존재함을 보여주었다. 본 실시예에서는 본 발명에 따른 TRPs가 세포막 투과 후 특정 소기관 또는 구조에 특이적으로 존재하는지를 알아보기 위하여, 상기 구조와 유사한 배열을 갖는 F-actin 스트레스 섬유 (stress fiber)에 대한 특이 결합인자인 phalloidin 면역형광염색(*Science* , 276:1425, 1997)을 실시하고, 공초점 형광현미경(confocal fluorescent microscope)으로 관찰하였다 (도 29). 이때, TRP-1과 TRP-2는 실시예 9와 동일한 방법으로 형광염색하였고, F-actin 특이적 염색을 위해 Phalloidin-Alexa-594 (Molecular Probes)를 사용하였다. 도 29에서, Merge 사진의 미약한 청색 이미지는 세포핵의 하단 부위를 나타낸다.

<146> 그 결과, 도 29에 도시된 바와 같이, 본 발명의 TRP-1 및 TRP-2는 투여 후에 세포의 F-actin과 동일한 배열을 가질 뿐만 아니라, 같은 위치에 존재함을 알 수 있었다. 이는 본 발명의 TRPs가 세포내로 투과된 후에 F-actin에 특이적으로 반응하여 결합하는 것을 나타내는 것이다. 이 결과로부터, TRPs가 세포내로 투과되면 세포질내에 무작위로 분포를 하는 것이 아니라, F-actin에 특이적으로 결합하고, 세포내 다양한 활성화 과정과 퓨린 절단 과정을 거쳐 활성화 BMP로 전환된다는 것을 알 수 있었다.

<147>

<148> 실시예 11: 동물 실험 모델에서 TRPs에 의한 골 형성 유도

<149> 실시예 1 내지 10에서, 본 발명의 TRP-1 및 TRP-2가 세포막을 투과하여 퓨린에 의해 활성화되어 분비되고, 이들이 골세포의 분화와 석회화 물질의 형성을 유도한다는 것을 보여주었다. 본 실시예에서는 본 발명에 따른 TRPs가 생체내에서 골 형성을 유도하는지 알아보기 위하여, 생쥐(rat)의 두개골에 자연 치유 불가능한 손상(8 mm critical defect)을 입힌 다음, 본 발명에 따른 TRP-1을 시판중인 rhBMP-2와 비교 투여하여 골 형성 유도를 관찰하였다 (도 30). 이때, 자연치유 불가능 손상을 만들기 위해 생쥐(rat)의 두개골에 8 mm 지름의 트레핀(trephine)을 이용하여 골 손상부를 형성하였다. 음성 대조군(negative control)에는 제1형 교원질(type I collagen)을, 양성 대조군(rhBMP)에는 시판중인 재조합 BMP2를 제1형 교원질에 혼합하여 이용하였고, 본 발명의 TRP-1을 양성 대조군과 동일한 방법으로 투여하였다. rhBMP-2와 TRP-1은 각각 10 nmole 투여하였다. BMP 투여 2주후에 각 실험군의조직을 채득하여 10% 포르말린에 24시간 고정하고, 4 μ m의 절편을 hematoxylin/eosin 염색한 다음, 광학 현미경으로 관찰하였다. 도 30에서, 화살표 양쪽은 골 손상부위의 말단부를 나타내며, 제일 아래의 박스는 TRP-1에 의한 골 형성 부위를 확대한 것이다.

<150> 그 결과, 도 30에 도시된 바와 같이, 본 발명의 TRP-1 투여 2주 만에 생체 내에서 왕성한 골세포 분화와 골 형성 유도를 확인할 수 있었다. 또한 동일한 양의 TRP-1을 투여한 경우, 시판중인 rhBMP-2에 비해, 우수하거나 최소한 비슷한 역가(potency)를 나타냈다.

<151> 실시예 12: TRPs의 세포독성

<152> 실시예 1 내지 11에서 본 발명에 따른 TRPs를 세포 또는 조직에 투여했을 때 작용 기작과 응용 가능성을 제시하였다. 마지막으로, 본 발명의 TRPs를 과량 투여한 경우의 세포독성을 알아보기 위하여, 시판중인 rhBMP와 함께 200 nM까지 농도를 높여가며 세포독성을 검사하였다. 이때, TRP-1과 재조합 BMP2를 1차 배양된 섬유세포에 각 농도별로 투여하고, 72시간 후 생존한 세포의 수를 측정하였다 (도 31). 그 결과, 도 31에 나타난 바와 같이, TRP-1을 200 nM 투여한 경우에도 세포독성을 전혀 나타내지 않았다.

<153> 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시예일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 예컨대, 본 발명의 TRP-1을 인체에 투여할 경우, 이미 입증한 바와 같이, 뼈 및 연골 형성을 촉진하는 데 유용하지만, 본 발명 TRP-2를 인체에 투여할 경우, 뼈나 연골의 형성 촉진 뿐 아니라 경우와 투약 조건에 따라서 신장, 간, 폐, 심장의 섬유화 및 경화를 해소하는 데에도 유용할 것으로 기대된다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

【발명의 효과】

<154> 이상 상세히 기술한 바와 같이, 본 발명은 종래 활성 단백질과는 전혀 다른 약리기전을 가지는 비활성 폴리펩티드를 제공하는 효과가 있다. 본 발명에 따른 TRP는 생체내로 투여되기 전까지는 비활성 상태이지만, 생체내에서 활성화되는 새로운 메카니즘을 가지고 있어, 세포막 수용체와의 결합을 3차원 구조를 유지를 위한 추가적인 장비나 비용이 필요 없다. 또한, 생산공정이 간단하고 분리·정제가 매우 용이하여 생산 단가가 낮으며, 보관, 취급 및 투여 과정도 편리하여 rhBMP류 등 동래 활성 단백질을 대체할 수 있을 것으로 기대된다.

【특허청구범위】

【청구항 1】

(a) 세포막 수용체의 도움 없이 세포막을 투과할 수 있게 하는 PTD(protein transduction domain); (b) 하나 이상의 프로프로테인 컨버타제 절단부위를 가지고 상기 프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 비활성 TRD(tissue regeneration domain)를 세포 내에서 활성화시키는 FAD(furin activation domain); 및 (c) 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단에 의해 활성화되어 세포내에서 조직 성장 또는 형성을 촉진하거나 조직재생을 유도하는 TRD를 함유하는 비활성 폴리펩티드(TRPs).

【청구항 2】

제1항에 있어서, 프로프로테인 컨버타제는 푸린인 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 3차원적 입체 규칙성을 가지지 않고, 그 자체로 활성을 가지지 않는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 FAD의 프로프로테인 컨버타제 절단부위가 세포내에서

프로프로테인 컨버타제에 의해 절단되어 상기 TRD가 활성화되고, 상기 활성화된 TRD는 세포외로 분비되는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 5】

제1항에 있어서, 상기 TRD는 BMPs, TGF- β , β -NGF(β -신경성장인자), β -amyloid, ADAMs(a disintegrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs(matrix metalloproteinases), 인슐린-유사 성장인자-1(IGF-1)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 6】

제1항에 있어서, 상기 TRD는 서열번호 1 내지 13으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 7】

제1항에 있어서, 상기 FAD는 서열번호 14 내지 26으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 8】

제1항에 있어서, 상기 PTD는 TAT, 초파리 유래 Antp 펩티드, VP22 펩티드 및

mph-1-btm로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 9】

제1항에 있어서, PTD와 FAD 및 TRD가 융합되어 있는 비활성 폴리펩티드.

【청구항 10】

TRD를 코딩하는 DNA의 5' 앞에 FAD를 코딩하는 염기서열, PTD의 염기서열, 태깅(tagging)을 위한 염기서열 및 분리·정제를 위한 4개 이상의 히스티딘(histidine)을 코딩하는 염기서열이 삽입되어 있는 재조합백터.

【청구항 11】

제10항의 재조합백터로 형질전환된 박테리아.

【청구항 12】

(a) 제11항의 형질전환된 박테리아를 배양하여 [PTD-FAD-TRD] 폴리펩티드를 발현시키는 단계; 및 (b) 상기 배양액을 원심분리한 후, 상등액과 세포 펠렛(cell pellet)에 요소용액을 가하여 상기 폴리펩티드의 2차원 및 3차원 구조를 제거하거나 1차원 선형 구조로 변형시킨 다음, [PTD-FAD-TRD] 폴리펩티드를 정제하는 단계를 포함하는 비활성 TRP의 제조방법.

【청구항 13】

제12항에 있어서, 상기 TRD는 BMPs, TGF- β , β -NGF(β -신경성장인자), β -amyloid, ADAMs(a disintegrin and metalloproteinase-like), TNF- α , MMPs(matrix metalloproteinases), 인슐린-유사 성장인자-1(IGF-1)로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 14】

제12항에 있어서, 상기 TRD는 서열번호 1 내지 13으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열인 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 15】

제12항에 있어서, 상기 FAD는 서열번호 14 내지 26으로 구성된 군에서 선택된 아미노산 서열로 표시되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 16】

제12항에 있어서, 상기 PTD는 TAT, 초파리 유래 Antp 펩티드, VP22 펩티드 및 mph-1-btm로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 17】

제12항에 있어서, 상기 정제단계는 상기 폴리펩티드를 니켈-티타늄 비드에 결합시키고, 이를 동일한 용액으로 세척한 다음, 이미다졸 (Imidazole)과 고염도 완충용액을 사용하여 용출하는 것을 특징으로 하는 방법.

【청구항 18】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 비활성 폴리펩티드를 유효성분으로 함유하는 조직 형성 또는 재생 촉진용 조성물.

【청구항 19】

제18항에 있어서, 골 또는 연골 형성 촉진용인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 20】

제19항에 있어서, TGF- β , IGF, PDGF 및 FGF로 구성된 군에서 선택된 성장인자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

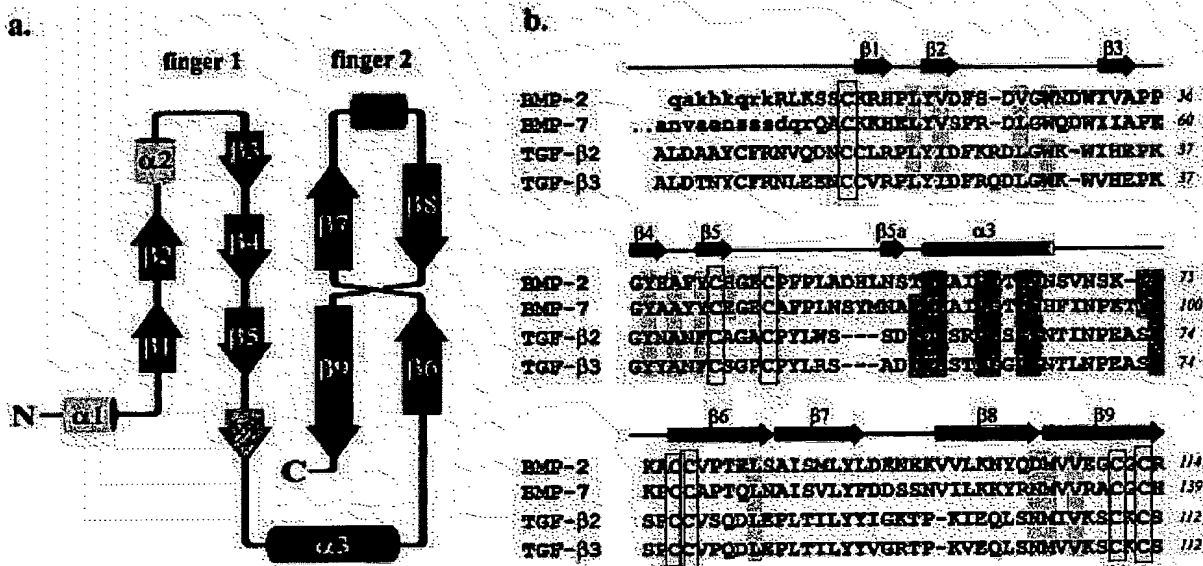
【청구항 21】

제1항 내지 제9항 중 어느 한 항의 비활성 폴리펩티드를 유효성분으로 함유하는 장기의 섬유화 또는 경화 해소용 조성물.

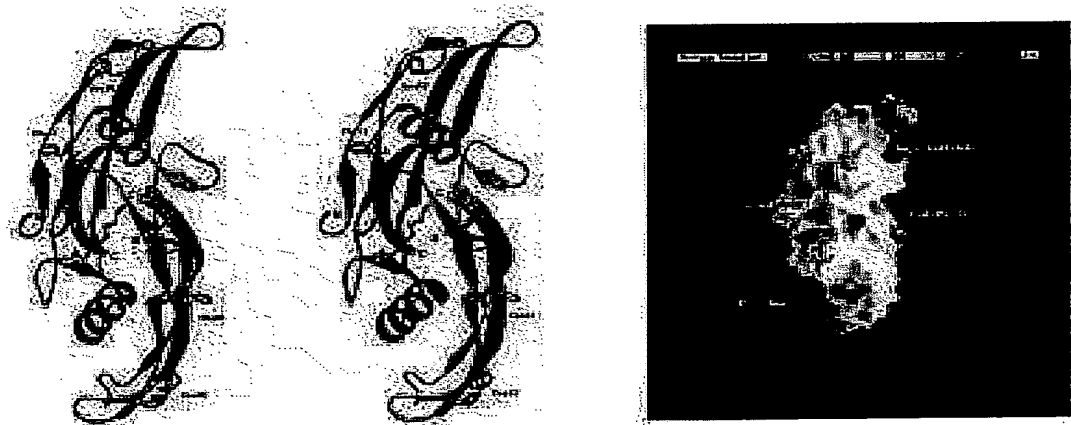
【청구항 22】

제21항에 있어서, TGF- β , IGF, PDGF 및 FGF로 구성된 군에서 선택된 성장인자를 추가로 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

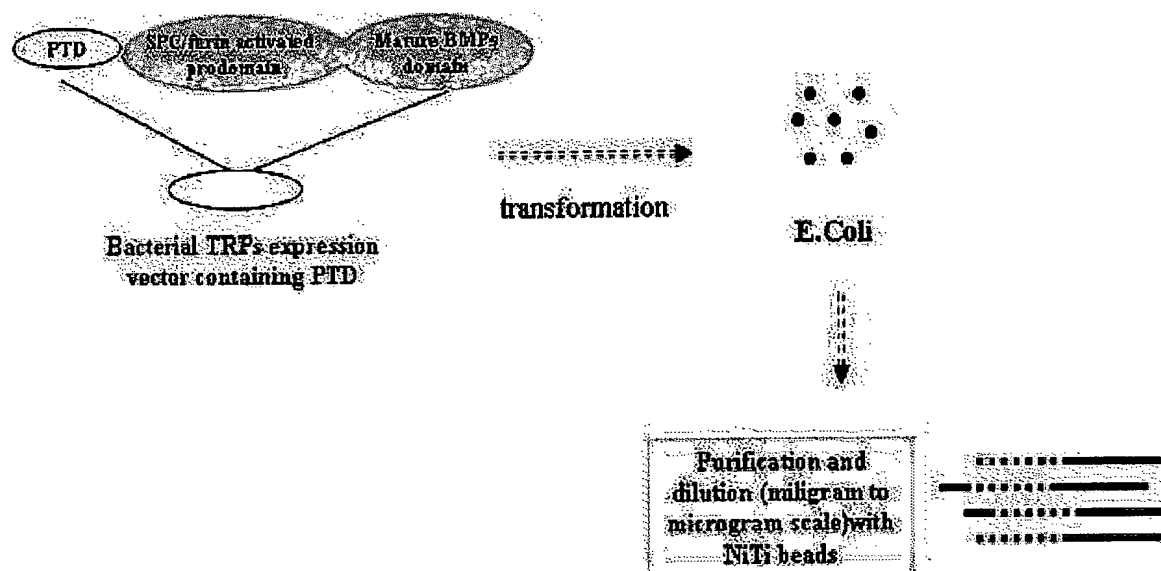
【도 1】



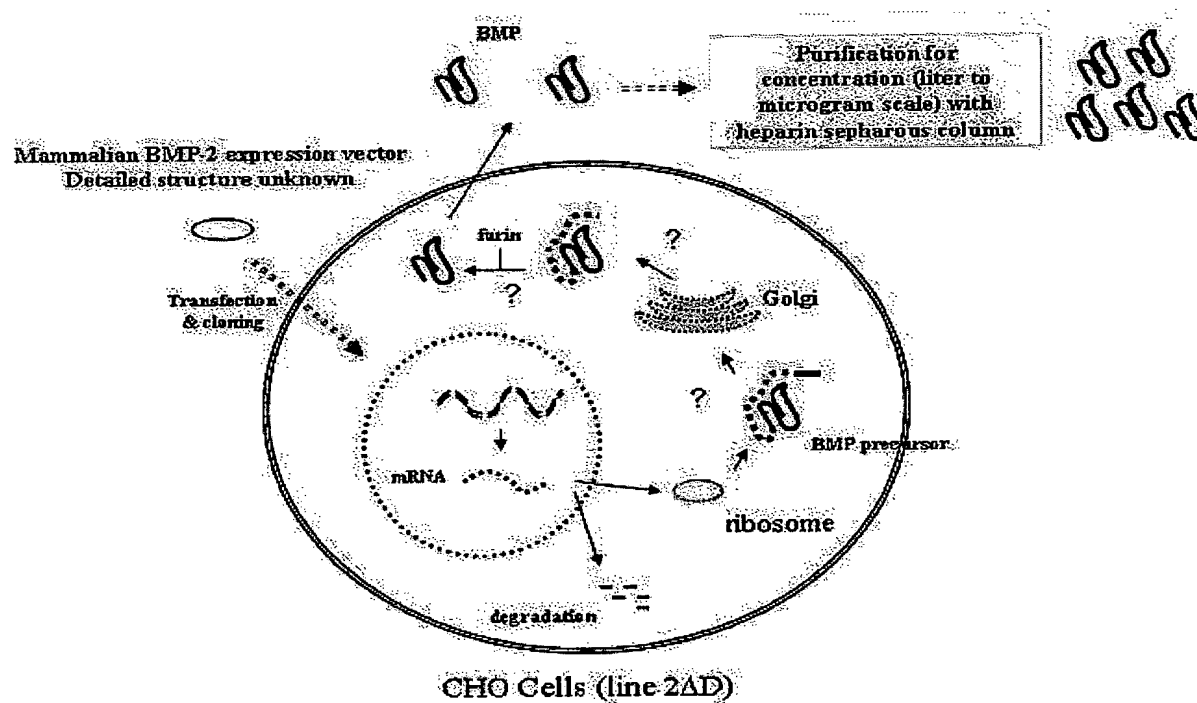
【도 2】



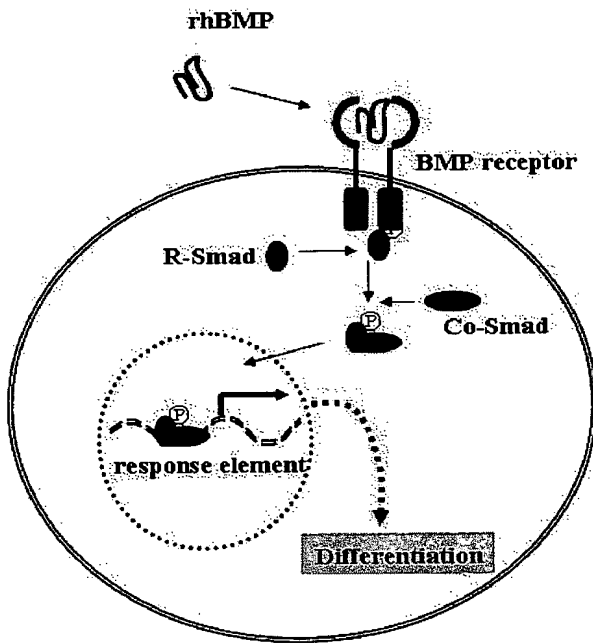
【도 3】



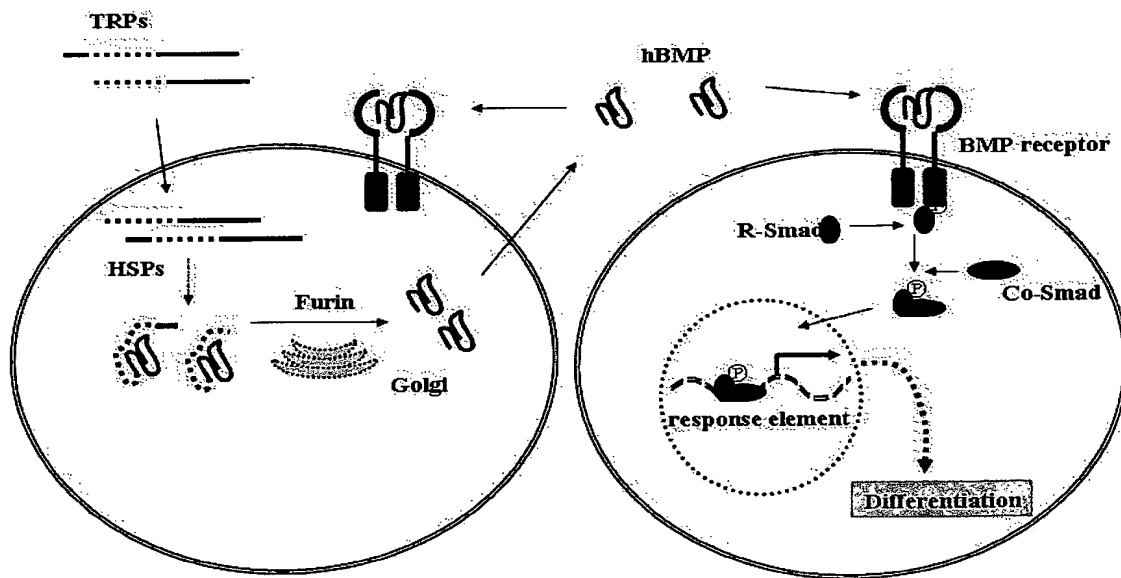
【도 4】



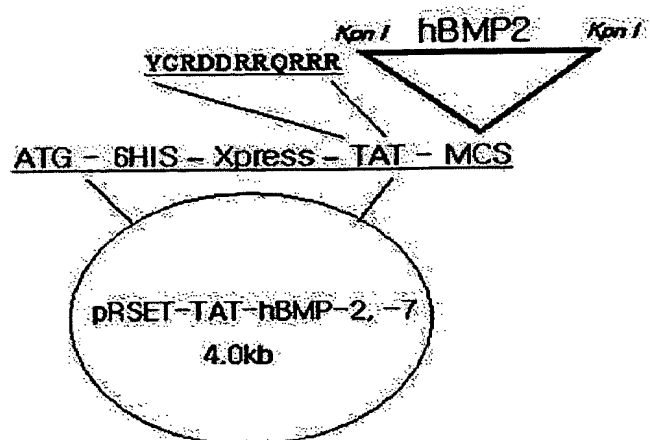
【도 5】



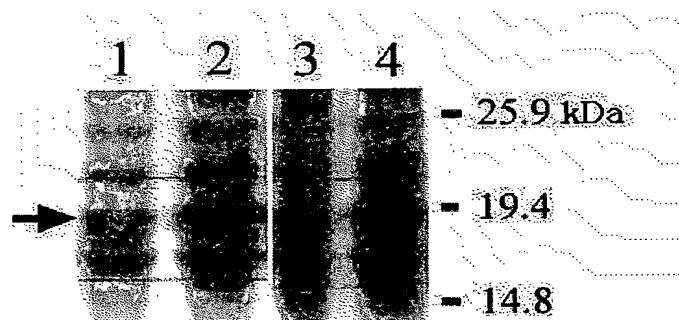
【도 6】



【도 7】



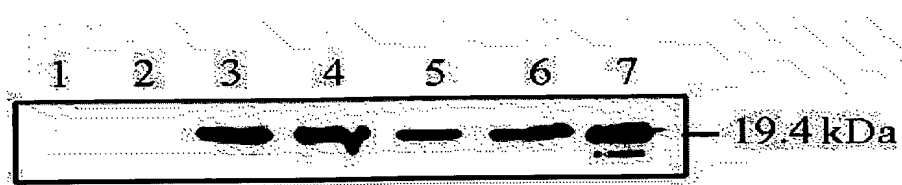
【도 8】



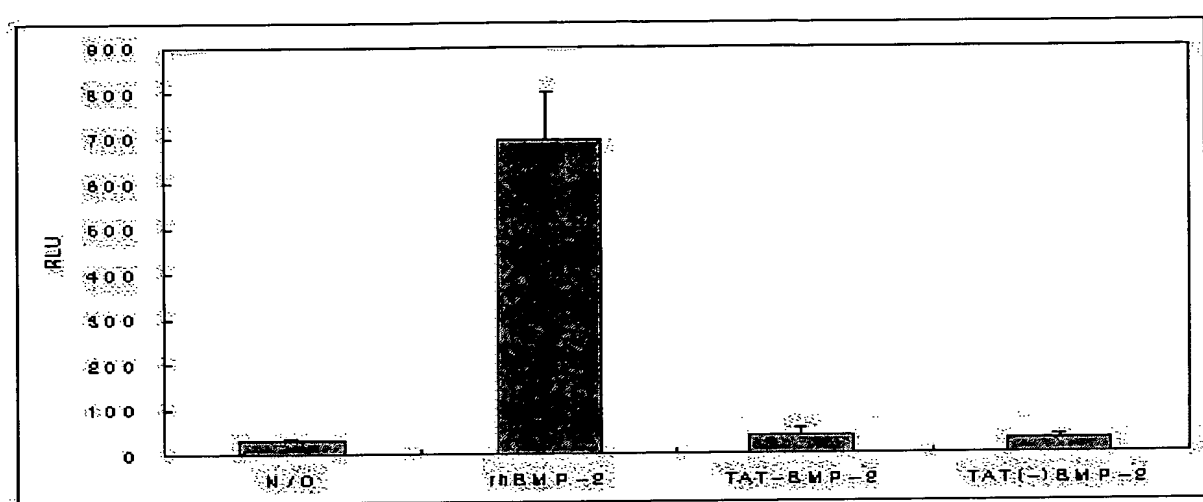
【도 9】



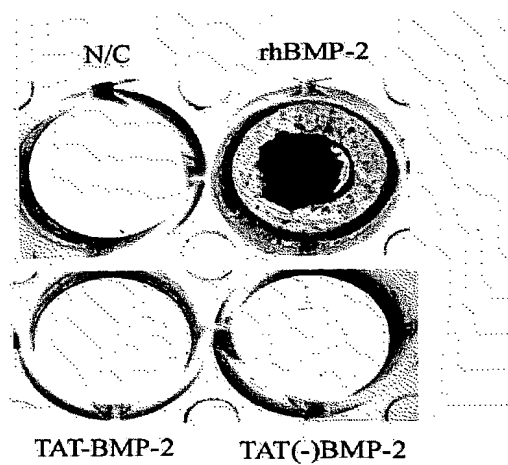
【도 10】



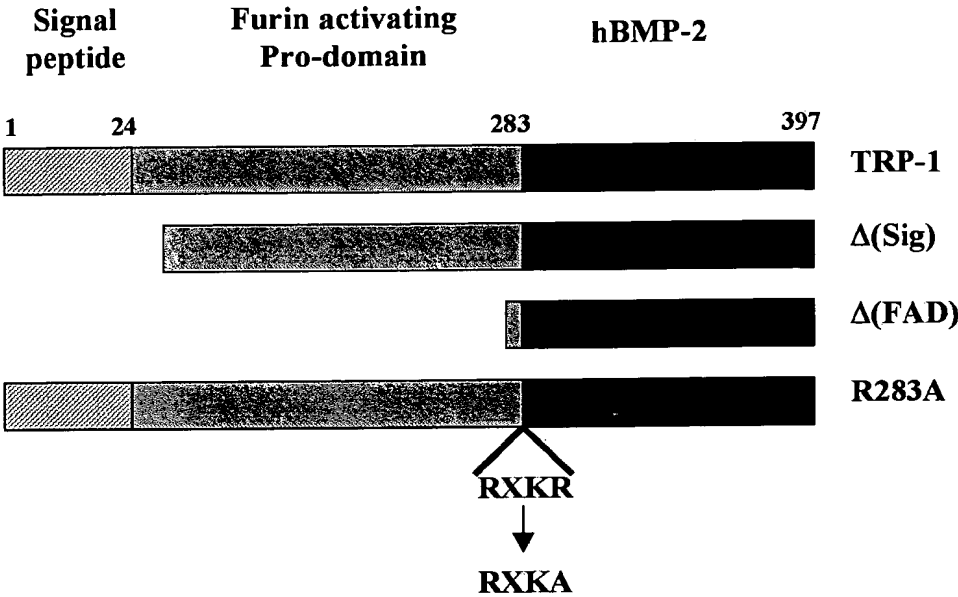
【도 11】



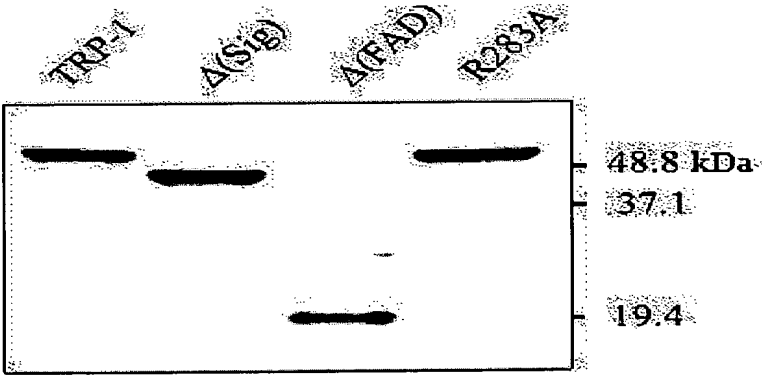
【도 12】



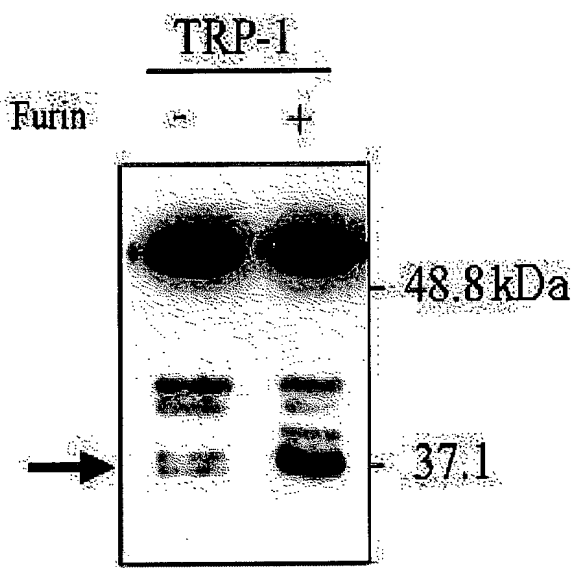
【도 13】



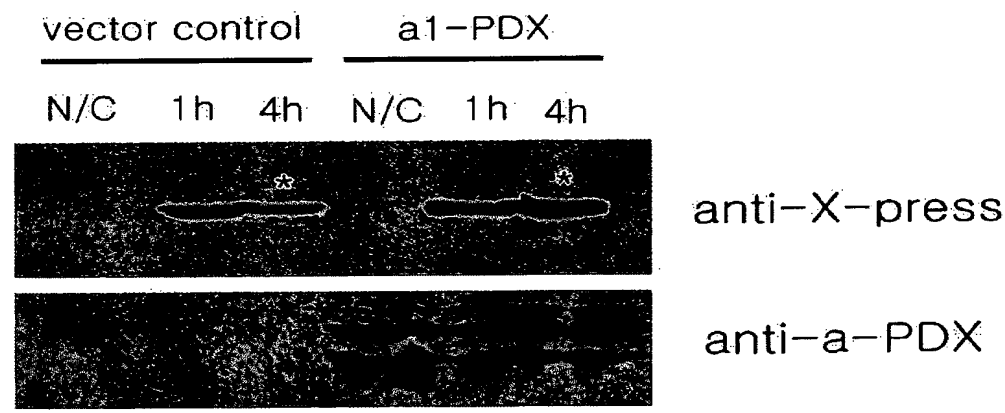
【도 14】



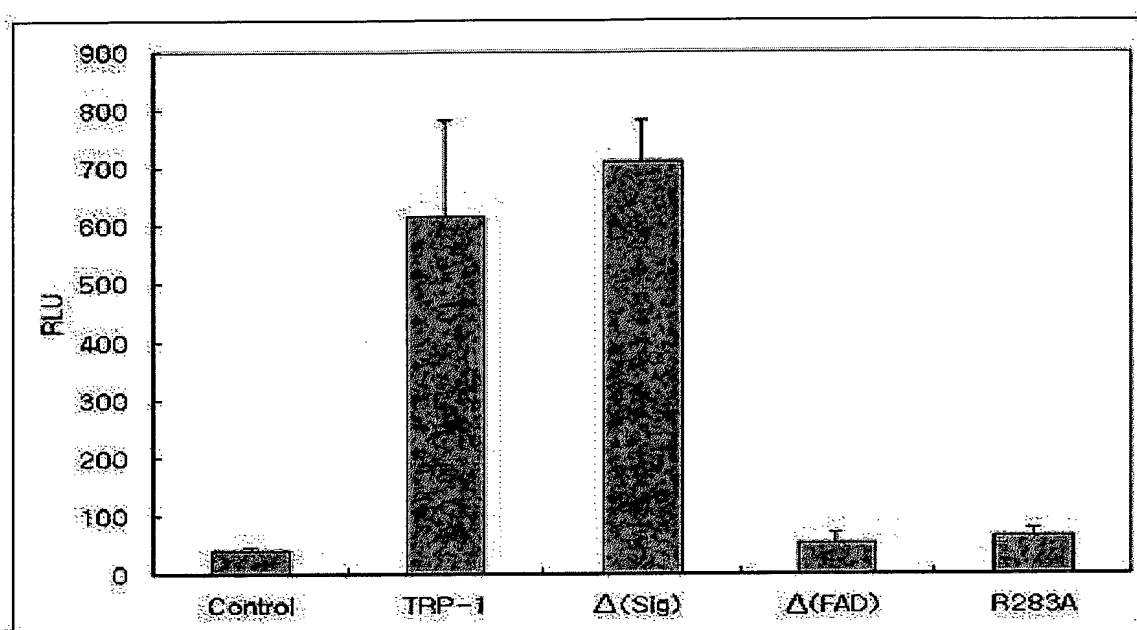
【図 15】



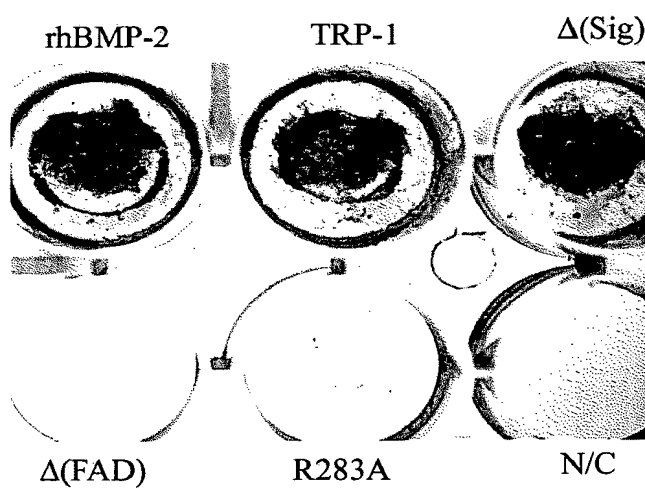
【図 16】



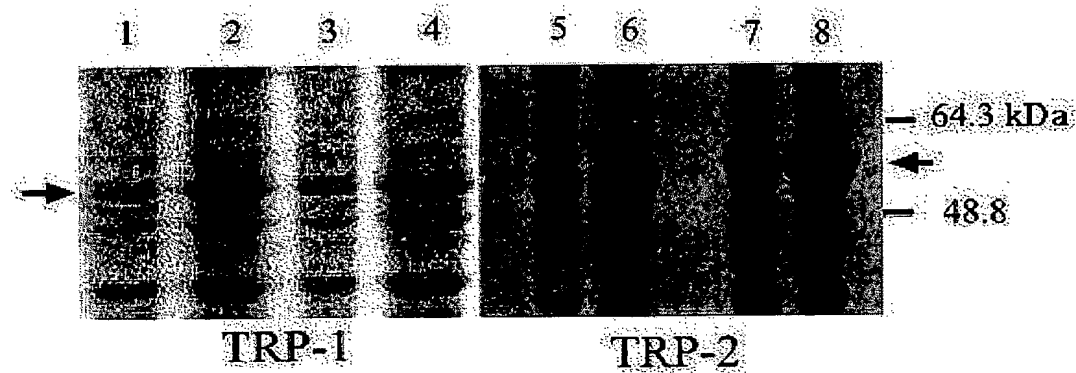
【도 17】



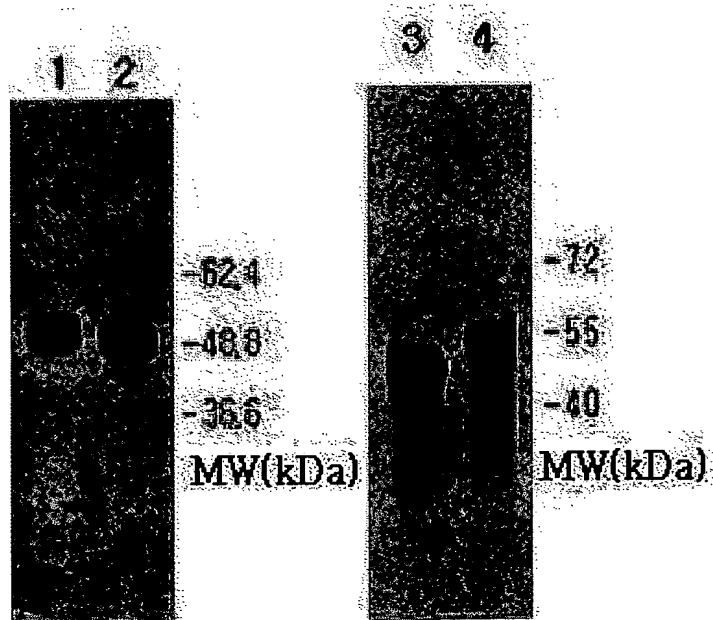
【도 18】



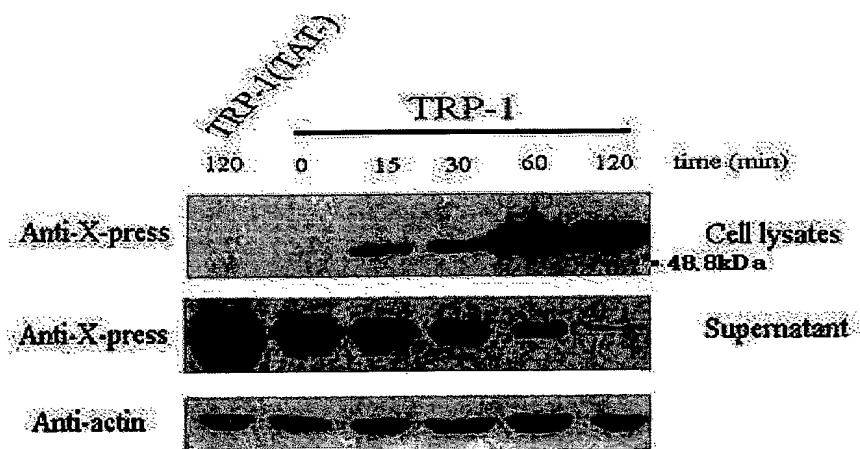
【도 19】



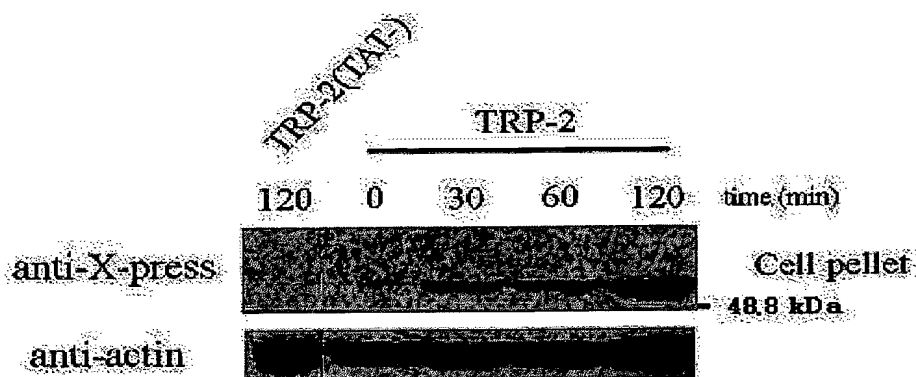
【도 20】



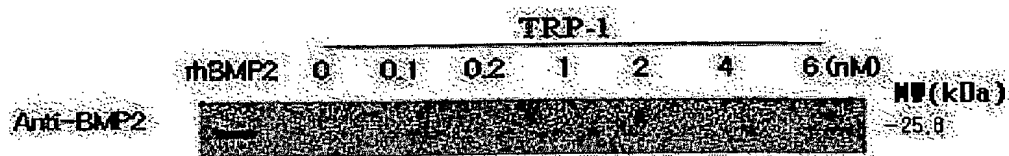
【図 21】



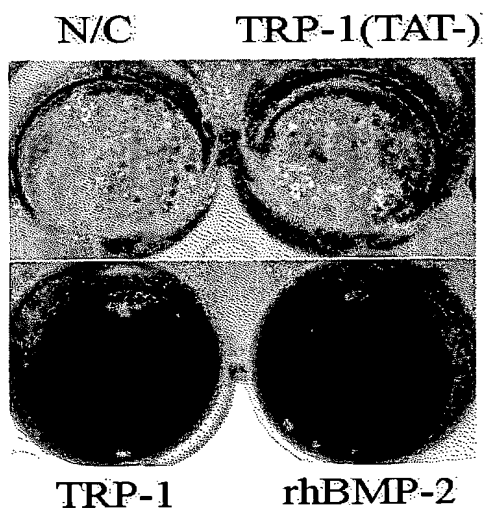
【図 22】



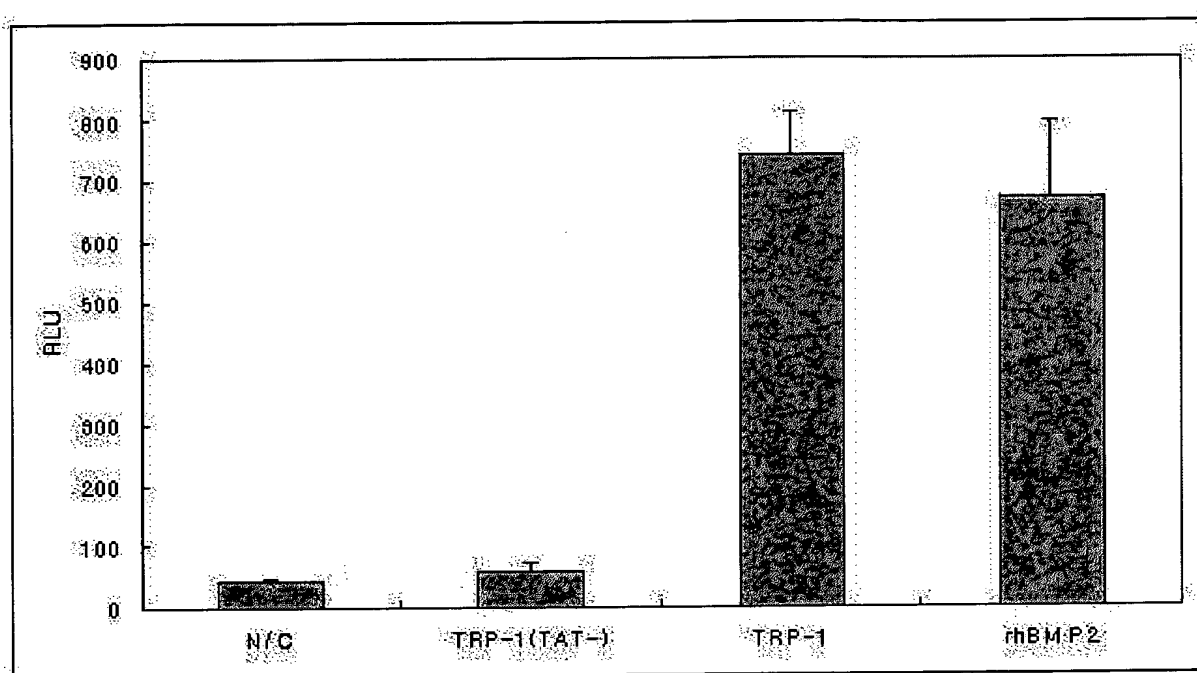
【도 23】



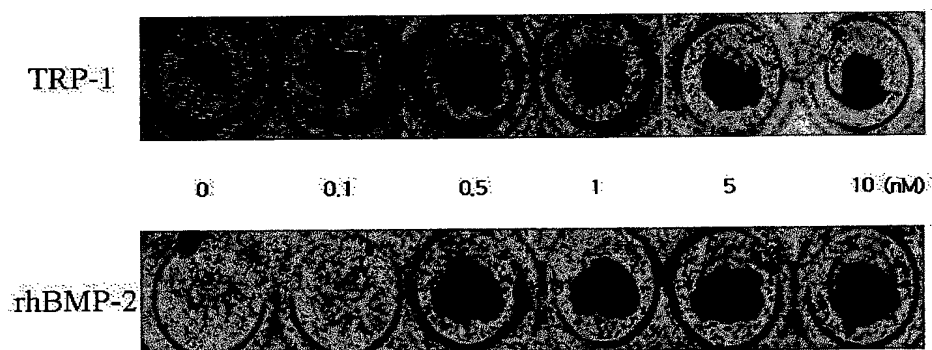
【도 24】



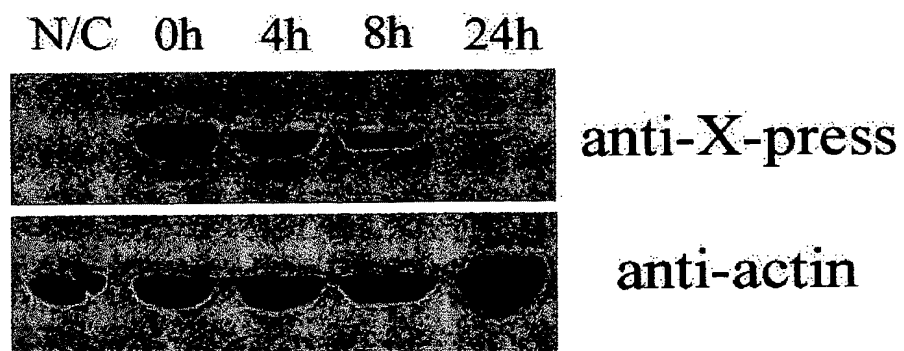
【도 25】



【도 26】

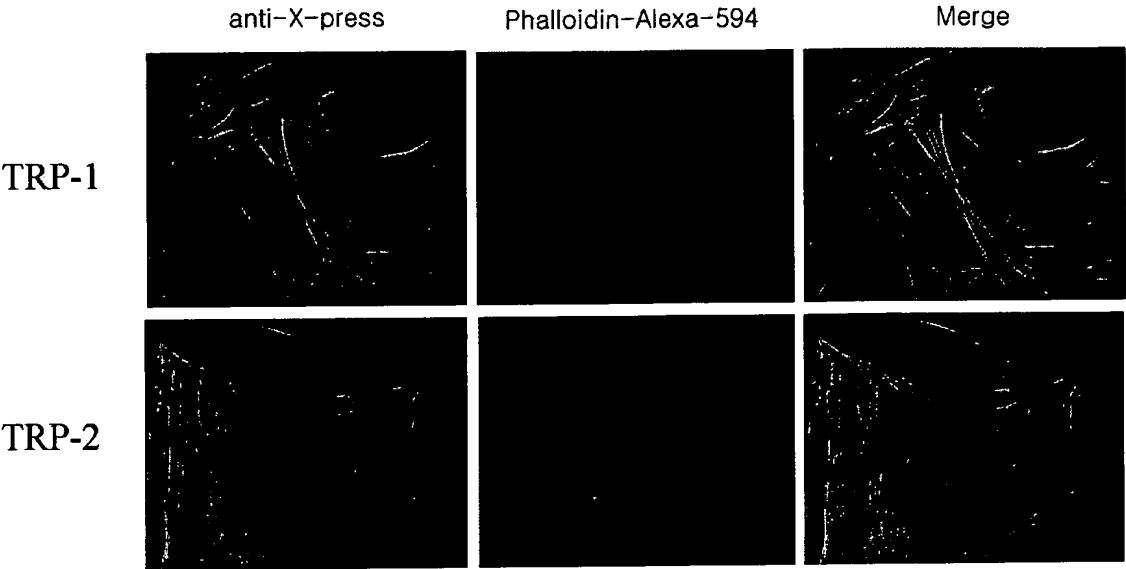


【도 27】

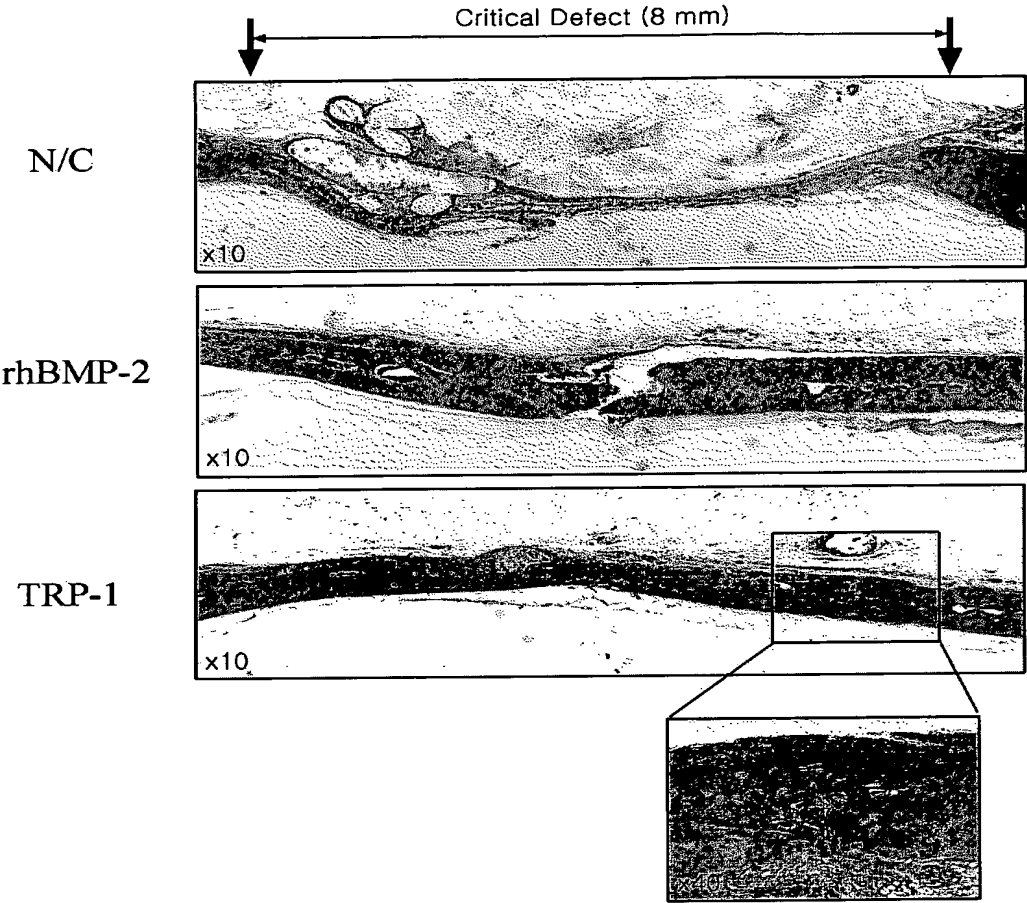


【도 28】

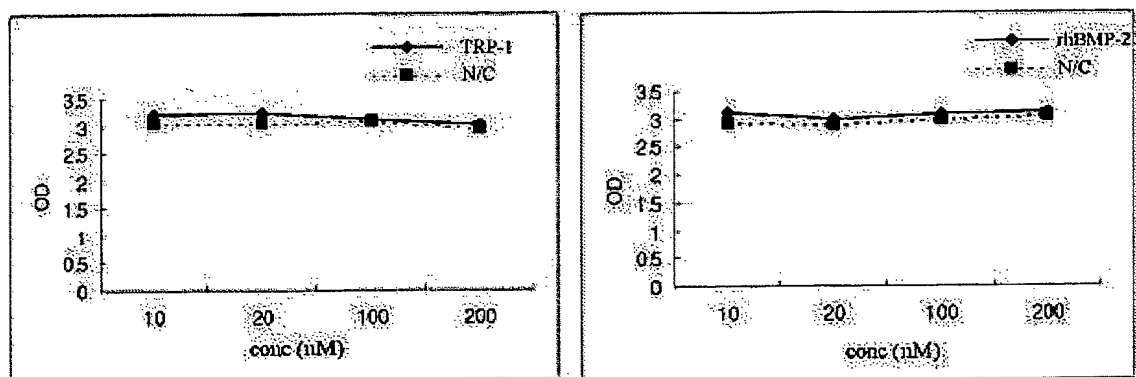
【도 29】



【도 30】



【도 31】



【서열목록】

서열목록 전자파일 첨부

【서열목록】

<110> KIM, JUNG MUN
YUK, JONG IN

<120> Non-activated Polypeptides having a function of tissue
regeneration and method for preparing the same

<130> P05-B216

<150> KR2005-26246

<151> 2005-03-30

<160> 26

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 114

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Gln Ala Lys His Lys Gln Arg Lys Arg Leu Lys Ser Ser Cys Lys Arg

1 5 10 15

His Pro Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp Trp Ile

20 25 30

Val Ala Pro Pro Gly Tyr His Ala Phe Tyr Cys His Gly Glu Cys Pro

35 40 45

Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile Val Gln

50 55 60

Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Lys Ile Pro Lys Ala Cys Cys Val

65 70 75 80

Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu Asn Glu

85 90 95

Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Asp Met Val Val Glu Gly Cys Gly

100 105 110

Cys Arg

<210> 2

<211> 183

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Ser Thr Gly Val Leu Leu Pro Leu Gln Asn Asn Glu Leu Pro Gly Ala

1 5 10 15

Glu Tyr Gln Tyr Lys Lys Asp Glu Val Trp Glu Glu Arg Lys Pro Tyr

20 25 30

Lys Thr Leu Gln Ala Gln Ala Pro Glu Lys Ser Lys Asn Lys Lys Lys

35 40 45

Gln Arg Lys Gly Pro His Arg Lys Ser Gln Thr Leu Gln Phe Asp Glu

50 55 60

Gln Thr Leu Lys Lys Ala Arg Arg Lys Gln Trp Ile Glu Pro Arg Asn

65 70 75 80

Cys Ala Arg Arg Tyr Leu Lys Val Asp Phe Ala Asp Ile Gly Trp Ser

85 90 95

Glu Trp Ile Ile Ser Pro Lys Ser Phe Asp Ala Tyr Tyr Cys Ser Gly

100 105 110

Ala Cys Gln Phe Pro Met Pro Lys Ser Leu Lys Pro Ser Asn His Ala

115

120

125

Thr Ile Gln Ser Ile Val Arg Ala Val Gly Val Val Pro Gly Ile Pro

130

135

140

Glu Pro Cys Cys Val Pro Glu Lys Met Ser Ser Leu Ser Ile Leu Phe

145

150

155

160

Phe Asp Glu Asn Lys Asn Val Val Leu Lys Val Tyr Pro Asn Met Thr

165

170

175

Val Glu Ser Cys Ala Cys Arg

180

<210> 3

<211> 116

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Ser Pro Lys His His Ser Gln Arg Ala Arg Lys Lys Asn Lys Asn Cys

1

5

10

15

Arg Arg His Ser Leu Tyr Val Asp Phe Ser Asp Val Gly Trp Asn Asp

20

25

30

Trp Ile Val Ala Pro Pro Gly Tyr Gln Ala Phe Tyr Cys His Gly Asp

35

40

45

Cys Pro Phe Pro Leu Ala Asp His Leu Asn Ser Thr Asn His Ala Ile

50

55

60

Val Gln Thr Leu Val Asn Ser Val Asn Ser Ser Ile Pro Lys Ala Cys

65

70

75

80

Cys Val Pro Thr Glu Leu Ser Ala Ile Ser Met Leu Tyr Leu Asp Glu

	85	90	95
Tyr Asp Lys Val Val Leu Lys Asn Tyr Gln Glu Met Val Val Glu Gly			
	100	105	110
Cys Gly Cys Arg			
	115		
<210>	4		
<211>	138		
<212>	PRT		
<213>	Homo sapiens		
<400>	4		
Ala Ala Asn Lys Arg Lys Asn Gln Asn Arg Asn Lys Ser Ser Ser His			
1	5	10	15
Gln Asp Ser Ser Arg Met Ser Ser Val Gly Asp Tyr Asn Thr Ser Glu			
	20	25	30
Gln Lys Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg Asp			
	35	40	45
Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala Phe			
	50	55	60
Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn Ala			
65	70	75	80
Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Phe Pro Asp			
	85	90	95
His Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile Ser			
	100	105	110
Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr Arg			

115

120

125

Asn Met Val Val Arg Ser Cys Gly Cys His

130

135

<210> 5

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

Ser Ala Ser Ser Arg Arg Arg Gln Gln Ser Arg Asn Arg Ser Thr Gln

1

5

10

15

Ser Gln Asp Val Ala Arg Val Ser Ser Ala Ser Asp Tyr Asn Ser Ser

20

25

30

Glu Leu Lys Thr Ala Cys Arg Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln

35

40

45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Lys Gly Tyr Ala Ala

50

55

60

Asn Tyr Cys Asp Gly Glu Cys Ser Phe Pro Leu Asn Ala His Met Asn

65

70

75

80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Met Asn Pro

85

90

95

Glu Tyr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Asn Ala Ile

100

105

110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Asn Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr

115

120

125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His

130

135

<210> 6

<211> 139

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

Ser Thr Gly Ser Lys Gln Arg Ser Gln Asn Arg Ser Lys Thr Pro Lys

1 5 10 15

Asn Gln Glu Ala Leu Arg Met Ala Asn Val Ala Glu Asn Ser Ser Ser

20 25 30

Asp Gln Arg Gln Ala Cys Lys Lys His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Arg

35 40 45

Asp Leu Gly Trp Gln Asp Trp Ile Ile Ala Pro Glu Gly Tyr Ala Ala

50 55 60

Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu Cys Ala Phe Pro Leu Asn Ser Tyr Met Asn

65 70 75 80

Ala Thr Asn His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Phe Ile Asn Pro

85 90 95

Glu Thr Val Pro Lys Pro Cys Cys Ala Pro Thr Gln Leu Asn Ala Ile

100 105 110

Ser Val Leu Tyr Phe Asp Asp Ser Ser Asn Val Ile Leu Lys Lys Tyr

115 120 125

Arg Asn Met Val Val Arg Ala Cys Gly Cys His

130 135

<210> 7

<211> 133
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 7
 Arg Arg Gln Pro Lys Lys Ser Asn Glu Leu Pro Gln Ala Asn Arg Leu
 1 5 10 15
 Pro Gly Ile Phe Asp Asp Val His Gly Ser His Gly Arg Gln Val Cys
 20 25 30
 Arg Arg His Glu Leu Tyr Val Ser Phe Gln Asp Leu Gly Trp Leu Asp
 35 40 45
 Trp Val Ile Ala Pro Gln Gly Tyr Ser Ala Tyr Tyr Cys Glu Gly Glu
 50 55 60
 Cys Ser Phe Pro Leu Asp Ser Cys Met Asn Ala Thr Asn His Ala Ile
 65 70 75 80
 Leu Gln Ser Leu Val His Leu Met Met Pro Asp Ala Val Pro Lys Ala
 85 90 95
 Cys Cys Ala Pro Thr Lys Leu Ser Ala Thr Ser Val Leu Tyr Tyr Asp
 100 105 110
 Ser Ser Asn Asn Val Ile Leu Arg Lys His Arg Asn Met Val Val Lys
 115 120 125
 Ala Cys Gly Cys His
 130

<210> 8
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 8

Ser Ala Gly Ala Gly Ser His Cys Gln Lys Thr Ser Leu Arg Val Asn

1 5 10 15

Phe Glu Asp Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Lys Glu Tyr

20 25 30

Glu Ala Tyr Glu Cys Lys Gly Gly Cys Phe Phe Pro Leu Ala Asp Asp

35 40 45

Val Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Val Gln Thr Leu Val His Leu Lys

50 55 60

Phe Pro Thr Lys Val Gly Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Ser

65 70 75 80

Pro Ile Ser Val Leu Tyr Lys Asp Asp Met Gly Val Pro Thr Leu Lys

85 90 95

Tyr His Tyr Glu Gly Met Ser Val Ala Glu Cys Gly Cys Arg

100 105 110

<210> 9

<211> 108

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe

1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu

20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu

35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
65 70 75 80

Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys
85 90 95

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg
100 105

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10
Asn Ala Lys Gly Asn Tyr Cys Lys Arg Thr Pro Leu Tyr Ile Asp Phe
1 5 10 15

Lys Glu Ile Gly Trp Asp Ser Trp Ile Ile Ala Pro Pro Gly Tyr Glu
20 25 30

Ala Tyr Glu Cys Arg Gly Val Cys Asn Tyr Pro Leu Ala Glu His Leu
35 40 45

Thr Pro Thr Lys His Ala Ile Ile Gln Ala Leu Val His Leu Lys Asn
50 55 60

Ser Gln Lys Ala Ser Lys Ala Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Glu Pro
65 70 75 80

Ile Ser Ile Leu Tyr Leu Asp Lys Gly Val Val Thr Tyr Lys Phe Lys
85 90 95

Tyr Glu Gly Met Ala Val Ser Glu Cys Gly Cys Arg

<210> 11

<211> 104

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Arg Cys Ser Arg Lys Pro Leu His Val Asp Phe Lys Glu Leu Gly

1 5 10 15

Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Asp Tyr Glu Ala Tyr His Cys

20 25 30

Glu Gly Leu Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn

35 40 45

His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Leu Asn Ser Met Ala Pro Asp Ala Ala

50 55 60

Pro Ala Ser Cys Cys Val Pro Ala Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu

65 70 75 80

Tyr Ile Asp Ala Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met

85 90 95

Val Val Glu Ala Cys Gly Cys Arg

100

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 12

Thr Ala Phe Ala Ser Arg His Gly Lys Arg His Gly Lys Lys Ser Arg

1	5	10	15
Leu Arg Cys Ser Lys Lys Pro Leu His Val Asn Phe Lys Glu Leu Gly			
20	25	30	
Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Tyr His Cys			
35	40	45	
Glu Gly Val Cys Asp Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn			
50	55	60	
His Ala Ile Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Gly Ser Thr			
65	70	75	80
Pro Pro Ser Cys Cys Val Pro Thr Lys Leu Thr Pro Ile Ser Ile Leu			
85	90	95	
Tyr Ile Asp Ala Gly Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met			
100	105	110	
Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg			
115	120		

<210> 13
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 13
 Ala Pro Leu Ala Thr Arg Gln Gly Lys Arg Pro Ser Lys Asn Leu Lys
 1 5 10 15
 Ala Arg Cys Ser Arg Lys Ala Leu His Val Asn Phe Lys Asp Met Gly
 20 25 30
 Trp Asp Asp Trp Ile Ile Ala Pro Leu Glu Tyr Glu Ala Phe His Cys

35

40

45

Glu Gly Leu Cys Glu Phe Pro Leu Arg Ser His Leu Glu Pro Thr Asn

50

55

60

His Ala Val Ile Gln Thr Leu Met Asn Ser Met Asp Pro Glu Ser Thr

65

70

75

80

Pro Pro Thr Cys Cys Val Pro Thr Arg Leu Ser Pro Ile Ser Ile Leu

85

90

95

Phe Ile Asp Ser Ala Asn Asn Val Val Tyr Lys Gln Tyr Glu Asp Met

100

105

110

Val Val Glu Ser Cys Gly Cys Arg

115

120

<210> 14

<211> 281

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 14

Met Val Ala Gly Thr Arg Cys Leu Leu Ala Leu Leu Leu Pro Gln Val

1

5

10

15

Leu Leu Gly Gly Ala Ala Gly Leu Val Pro Glu Leu Gly Arg Arg Lys

20

25

30

Phe Ala Ala Ala Ser Ser Gly Arg Pro Ser Ser Gln Pro Ser Asp Glu

35

40

45

Val Leu Ser Glu Phe Glu Leu Arg Leu Leu Ser Met Phe Gly Leu Lys

50

55

60

Gln Arg Pro Thr Pro Ser Arg Asp Ala Val Val Pro Pro Tyr Met Leu

65	70	75	80
Asp Leu Tyr Arg Arg His Ser Gly Gln Pro Gly Ser Pro Ala Pro Asp			
	85	90	95
His Arg Leu Glu Arg Ala Ala Ser Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe			
	100	105	110
His His Glu Glu Ser Leu Glu Glu Leu Pro Glu Thr Ser Gly Lys Thr			
	115	120	125
Thr Arg Arg Phe Phe Phe Asn Leu Ser Ser Ile Pro Thr Glu Glu Phe			
	130	135	140
Ile Thr Ser Ala Glu Leu Gln Val Phe Arg Glu Gln Met Gln Asp Ala			
	145	150	155
Leu Gly Asn Asn Ser Ser Phe His His Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Ile			
	165	170	175
Ile Lys Pro Ala Thr Ala Asn Ser Lys Phe Pro Val Thr Arg Leu Leu			
	180	185	190
Asp Thr Arg Leu Val Asn Gln Asn Ala Ser Arg Trp Glu Ser Phe Asp			
	195	200	205
Val Thr Pro Ala Val Met Arg Trp Thr Ala Gly His Ala Asn His Gly			
	210	215	220
Phe Val Val Glu Val Ala His Leu Glu Glu Lys Gln Gly Val Ser Lys			
	225	230	235
Arg His Val Arg Ile Ser Arg Ser Leu His Gln Asp Glu His Ser Trp			
	245	250	255
Ser Gln Ile Arg Pro Leu Leu Val Thr Phe Gly His Asp Gly Lys Gly			
	260	265	270

His Pro Leu His Lys Arg Glu Lys Arg

275

280

<210> 15

<211> 289

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 15

Met Ala Gly Ala Ser Arg Leu Leu Phe Leu Trp Leu Gly Cys Phe Cys

1

5

10

15

Val Ser Leu Ala Gln Gly Glu Arg Pro Lys Pro Pro Phe Pro Glu Leu

20

25

30

Arg Lys Ala Val Pro Gly Asp Arg Thr Ala Gly Gly Gly Pro Asp Ser

35

40

45

Glu Leu Gln Pro Gln Asp Lys Val Ser Glu His Met Leu Arg Leu Tyr

50

55

60

Asp Arg Tyr Ser Thr Val Gln Ala Ala Arg Thr Pro Gly Ser Leu Glu

65

70

75

80

Gly Gly Ser Gln Pro Trp Arg Pro Arg Leu Leu Arg Glu Gly Asn Thr

85

90

95

Val Arg Ser Phe Arg Ala Ala Ala Ala Glu Thr Leu Glu Arg Lys Gly

100

105

110

Leu Tyr Ile Phe Asn Leu Thr Ser Leu Thr Lys Ser Glu Asn Ile Leu

115

120

125

Ser Ala Thr Leu Tyr Phe Cys Ile Gly Glu Leu Gly Asn Ile Ser Leu

130

135

140

Ser Cys Pro Val Ser Gly Gly Cys Ser His His Ala Gln Arg Lys His

145	150	155	160
Ile Gln Ile Asp Leu Ser Ala Trp Thr Leu Lys Phe Ser Arg Asn Gln			
165	170	175	
Ser Gln Leu Leu Gly His Leu Ser Val Asp Met Ala Lys Ser His Arg			
180	185	190	
Asp Ile Met Ser Trp Leu Ser Lys Asp Ile Thr Gln Phe Leu Arg Lys			
195	200	205	
Ala Lys Glu Asn Glu Glu Phe Leu Ile Gly Phe Asn Ile Thr Ser Lys			
210	215	220	
Gly Arg Gln Leu Pro Lys Arg Arg Leu Pro Phe Pro Glu Pro Tyr Ile			
225	230	235	240
Leu Val Tyr Ala Asn Asp Ala Ala Ile Ser Glu Pro Glu Ser Val Val			
245	250	255	
Ser Ser Leu Gln Gly His Arg Asn Phe Pro Thr Gly Thr Val Pro Lys			
260	265	270	
Trp Asp Ser His Ile Arg Ala Ala Leu Ser Ile Glu Arg Arg Lys Lys			
275	280	285	
Arg			

<210> 16
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 16
 Met Ile Pro Gly Asn Arg Met Leu Met Val Val Leu Leu Cys Gln Val

1	5	10	15
Leu Leu Gly Gly Ala Ser His Ala Ser Leu Ile Pro Glu Thr Gly Lys			
20	25	30	
Lys Lys Val Ala Glu Ile Gln Gly His Ala Gly Gly Arg Arg Ser Gly			
35	40	45	
Gln Ser His Glu Leu Leu Arg Asp Phe Glu Ala Thr Leu Leu Gln Met			
50	55	60	
Phe Gly Leu Arg Arg Arg Pro Gln Pro Ser Lys Ser Ala Val Ile Pro			
65	70	75	80
Asp Tyr Met Arg Asp Leu Tyr Arg Leu Gln Ser Gly Glu Glu Glu Glu			
85	90	95	
Glu Gln Ile His Ser Thr Gly Leu Glu Tyr Pro Glu Arg Pro Ala Ser			
100	105	110	
Arg Ala Asn Thr Val Arg Ser Phe His His Glu Glu His Leu Glu Asn			
115	120	125	
Ile Pro Gly Thr Ser Glu Asn Ser Ala Phe Arg Phe Leu Phe Asn Leu			
130	135	140	
Ser Ser Ile Pro Glu Asn Glu Ala Ile Ser Ser Ala Glu Leu Arg Leu			
145	150	155	160
Phe Arg Glu Gln Val Asp Gln Gly Pro Asp Trp Glu Arg Gly Phe His			
165	170	175	
Arg Ile Asn Ile Tyr Glu Val Met Lys Pro Pro Ala Glu Val Val Pro			
180	185	190	
Gly His Leu Ile Thr Arg Leu Leu Asp Thr Arg Leu Val His His Asn			
195	200	205	

Val Thr Arg Trp Glu Thr Phe Asp Val Ser Pro Ala Val Leu Arg Trp
210 215 220

Thr Arg Glu Lys Gln Pro Asn Tyr Gly Leu Ala Ile Glu Val Thr His
225 230 235 240

Leu His Gln Thr Arg Thr His Gln Gly Gln His Val Arg Ile Ser Arg
245 250 255

Ser Leu Pro Gln Gly Ser Gly Asn Trp Ala Gln Leu Arg Pro Leu Leu
260 265 270

Val Thr Phe Gly His Asp Gly Arg Gly His Ala Leu Thr Arg Arg Arg
275 280 285

Arg Ala Lys Arg
290

<210> 17
<211> 316
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

Met His Leu Thr Val Phe Leu Leu Lys Gly Ile Val Gly Phe Leu Trp
1 5 10 15

Ser Cys Trp Val Leu Val Gly Tyr Ala Lys Gly Gly Leu Gly Asp Asn
20 25 30

His Val His Ser Ser Phe Ile Tyr Arg Arg Leu Arg Asn His Glu Arg
35 40 45

Arg Glu Ile Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu Pro His Arg
50 55 60

Pro Arg Pro Phe Ser Pro Gly Lys Gln Ala Ser Ser Ala Pro Leu Phe

65	70	75	80
Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Thr Asn Glu Glu Asn Pro Glu Glu			
85	90	95	
Ser Glu Tyr Ser Val Arg Ala Ser Leu Ala Glu Glu Thr Arg Gly Ala			
100	105	110	
Arg Lys Gly Tyr Pro Ala Ser Pro Asn Gly Tyr Pro Arg Arg Ile Gln			
115	120	125	
Leu Ser Arg Thr Thr Pro Leu Thr Thr Gln Ser Pro Pro Leu Ala Ser			
130	135	140	
Leu His Asp Thr Asn Phe Leu Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe			
145	150	155	160
Val Asn Leu Val Glu Arg Asp Lys Asp Phe Ser His Gln Arg Arg His			
165	170	175	
Tyr Lys Glu Phe Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro His Gly Glu Ala			
180	185	190	
Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Asp Arg Ser Asn Asn Arg			
195	200	205	
Phe Glu Asn Glu Thr Ile Lys Ile Ser Ile Tyr Gln Ile Ile Lys Glu			
210	215	220	
Tyr Thr Asn Arg Asp Ala Asp Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Lys Ala			
225	230	235	240
Gln Ala Leu Asp Val Gly Trp Leu Val Phe Asp Ile Thr Val Thr Ser			
245	250	255	
Asn His Trp Val Ile Asn Pro Gln Asn Asn Leu Gly Leu Gln Leu Cys			
260	265	270	

Ala Glu Thr Gly Asp Gly Arg Ser Ile Asn Val Lys Ser Ala Gly Leu
 275 280 285

Val Gly Arg Gln Gly Pro Gln Ser Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe
 290 295 300

Phe Lys Ala Ser Glu Val Leu Leu Arg Ser Val Arg
 305 310 315

<210> 18
 <211> 374
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 18
 Met Pro Gly Leu Gly Arg Arg Ala Gln Trp Leu Cys Trp Trp Trp Gly
 1 5 10 15

Leu Leu Cys Ser Cys Cys Gly Pro Pro Pro Leu Arg Pro Pro Leu Pro
 20 25 30

Ala Ala Ala Ala Ala Ala Ala Gly Gly Gln Leu Leu Gly Asp Gly Gly
 35 40 45

Ser Pro Gly Arg Thr Glu Gln Pro Pro Pro Ser Pro Gln Ser Ser Ser
 50 55 60

Gly Phe Leu Tyr Arg Arg Leu Lys Thr Gln Glu Lys Arg Glu Met Gln
 65 70 75 80

Lys Glu Ile Leu Ser Val Leu Gly Leu Pro His Arg Pro Arg Pro Leu
 85 90 95

His Gly Leu Gln Gln Pro Gln Pro Pro Ala Leu Arg Gln Gln Glu Glu
 100 105 110

Gln Gln Gln Gln Gln Gln Leu Pro Arg Gly Glu Pro Pro Pro Gly Arg

115	120	125	
Leu Lys Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Leu Ser			
130	135	140	
Ala Asp Asn Asp Glu Asp Gly Ala Ser Glu Gly Glu Arg Gln Gln Ser			
145	150	155	160
Trp Pro His Glu Ala Ala Ser Ser Ser Gln Arg Arg Gln Pro Pro Pro			
165	170	175	
Gly Ala Ala His Pro Leu Asn Arg Lys Ser Leu Leu Ala Pro Gly Ser			
180	185	190	
Gly Ser Gly Gly Ala Ser Pro Leu Thr Ser Ala Gln Asp Ser Ala Phe			
195	200	205	
Leu Asn Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu Tyr			
210	215	220	
Asp Lys Glu Phe Ser Pro Arg Gln Arg His His Lys Glu Phe Lys Phe			
225	230	235	240
Asn Leu Ser Gln Ile Pro Glu Gly Glu Val Val Thr Ala Ala Glu Phe			
245	250	255	
Arg Ile Tyr Lys Asp Cys Val Met Gly Ser Phe Lys Asn Gln Thr Phe			
260	265	270	
Leu Ile Ser Ile Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Gln His Arg Asp Ser			
275	280	285	
Asp Leu Phe Leu Leu Asp Thr Arg Val Val Trp Ala Ser Glu Glu Gly			
290	295	300	
Trp Leu Glu Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn Leu Trp Val Val Thr			
305	310	315	320

Pro Gln His Asn Met Gly Leu Gln Leu Ser Val Val Thr Arg Asp Gly

325

330

335

Val His Val His Pro Arg Ala Ala Gly Leu Val Gly Arg Asp Gly Pro

340

345

350

Tyr Asp Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Val Ser Glu Val

355

360

365

His Val Arg Thr Thr Arg

370

<210> 19

<211> 292

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 19

Met His Val Arg Ser Leu Arg Ala Ala Ala Pro His Ser Phe Val Ala

1

5

10

15

Leu Trp Ala Pro Leu Phe Leu Leu Arg Ser Ala Leu Ala Asp Phe Ser

20

25

30

Leu Asp Asn Glu Val His Ser Ser Phe Ile His Arg Arg Leu Arg Ser

35

40

45

Gln Glu Arg Arg Glu Met Gln Arg Glu Ile Leu Ser Ile Leu Gly Leu

50

55

60

Pro His Arg Pro Arg Pro His Leu Gln Gly Lys His Asn Ser Ala Pro

65

70

75

80

Met Phe Met Leu Asp Leu Tyr Asn Ala Met Ala Val Glu Glu Gly Gly

85

90

95

Gly Pro Gly Gly Gln Gly Phe Ser Tyr Pro Tyr Lys Ala Val Phe Ser

100	105	110
Thr Gln Gly Pro Pro Leu Ala Ser Leu Gln Asp Ser His Phe Leu Thr		
115	120	125
Asp Ala Asp Met Val Met Ser Phe Val Asn Leu Val Glu His Asp Lys		
130	135	140
Glu Phe Phe His Pro Arg Tyr His His Arg Glu Phe Arg Phe Asp Leu		
145	150	155
		160
Ser Lys Ile Pro Glu Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala Glu Phe Arg Ile		
	165	170
		175
Tyr Lys Asp Tyr Ile Arg Glu Arg Phe Asp Asn Glu Thr Phe Arg Ile		
	180	185
		190
Ser Val Tyr Gln Val Leu Gln Glu His Leu Gly Arg Glu Ser Asp Leu		
	195	200
		205
Phe Leu Leu Asp Ser Arg Thr Leu Trp Ala Ser Glu Glu Gly Trp Leu		
	210	215
		220
Val Phe Asp Ile Thr Ala Thr Ser Asn His Trp Val Val Asn Pro Arg		
225	230	235
		240
His Asn Leu Gly Leu Gln Leu Ser Val Glu Thr Leu Asp Gly Gln Ser		
	245	250
		255
Ile Asn Pro Lys Leu Ala Gly Leu Ile Gly Arg His Gly Pro Gln Asn		
	260	265
		270
Lys Gln Pro Phe Met Val Ala Phe Phe Lys Ala Thr Glu Val His Phe		
	275	280
		285
Arg Ser Ile Arg		
290		

<210> 20
 <211> 269
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 20
 Met Thr Ala Leu Pro Gly Pro Leu Trp Leu Leu Gly Leu Ala Leu Cys
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Gly Gly Gly Pro Gly Leu Arg Pro Pro Pro Gly Cys Pro
 20 25 30

Gln Arg Arg Leu Gly Ala Arg Glu Arg Arg Asp Val Gln Arg Glu Ile
 35 40 45

Leu Ala Val Leu Gly Leu Pro Gly Arg Pro Arg Pro Arg Ala Pro Pro
 50 55 60

Ala Ala Ser Arg Leu Pro Ala Ser Ala Pro Leu Phe Met Leu Asp Leu
 65 70 75 80

Tyr His Ala Met Ala Gly Asp Asp Asp Glu Asp Gly Ala Pro Ala Glu
 85 90 95

Arg Arg Leu Gly Arg Ala Asp Leu Val Met Ser Phe Val Asn Met Val
 100 105 110

Glu Arg Asp Arg Ala Leu Gly His Gln Glu Pro His Trp Lys Glu Phe
 115 120 125

Arg Phe Asp Leu Thr Gln Ile Pro Ala Gly Glu Ala Val Thr Ala Ala
 130 135 140

Glu Phe Arg Ile Tyr Lys Val Pro Ser Ile His Leu Leu Asn Arg Thr
 145 150 155 160

Leu His Val Ser Met Phe Gln Val Val Gln Glu Gln Ser Asn Arg Glu

165

170

175

Ser Asp Leu Phe Phe Leu Asp Leu Gln Thr Leu Arg Ala Gly Asp Glu

180

185

190

Gly Trp Leu Val Leu Asp Val Thr Ala Ala Ser Asp Cys Trp Leu Leu

195

200

205

Lys Arg His Lys Asp Leu Gly Leu Arg Leu Tyr Val Glu Thr Glu Asp

210

215

220

Gly His Ser Val Asp Pro Gly Leu Ala Gly Leu Leu Gly Gln Arg Ala

225

230

235

240

Pro Arg Ser Gln Gln Pro Phe Val Val Thr Phe Phe Arg Ala Ser Pro

245

250

255

Ser Pro Ile Arg Thr Pro Arg Ala Val Arg Pro Leu Arg

260

265

<210> 21

<211> 318

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 21

Met Cys Pro Gly Ala Leu Trp Val Ala Leu Pro Leu Leu Ser Leu Leu

1

5

10

15

Ala Gly Ser Leu Gln Gly Lys Pro Leu Gln Ser Trp Gly Arg Gly Ser

20

25

30

Ala Gly Gly Asn Ala His Ser Pro Leu Gly Val Pro Gly Gly Gly Leu

35

40

45

Pro Glu His Thr Phe Asn Leu Lys Met Phe Leu Glu Asn Val Lys Val

50

55

60

Asp Phe Leu Arg Ser Leu Asn Leu Ser Gly Val Pro Ser Gln Asp Lys
 65 70 75 80

Thr Arg Val Glu Pro Pro Gln Tyr Met Ile Asp Leu Tyr Asn Arg Tyr
 85 90 95

Thr Ser Asp Lys Ser Thr Pro Ala Ser Asn Ile Val Arg Ser Phe Ser
 100 105 110

Met Glu Asp Ala Ile Ser Ile Thr Ala Thr Glu Asp Phe Pro Phe Gln
 115 120 125

Lys His Ile Leu Leu Phe Asn Ile Ser Ile Pro Arg His Glu Gln Ile
 130 135 140

Thr Arg Ala Glu Leu Arg Leu Tyr Val Ser Cys Gln Asn His Val Asp
 145 150 155 160

Pro Ser His Asp Leu Lys Gly Ser Val Val Ile Tyr Asp Val Leu Asp
 165 170 175

Gly Thr Asp Ala Trp Asp Ser Ala Thr Glu Thr Lys Thr Phe Leu Val
 180 185 190

Ser Gln Asp Ile Gln Asp Glu Gly Trp Glu Thr Leu Glu Val Ser Ser
 195 200 205

Ala Val Lys Arg Trp Val Arg Ser Asp Ser Thr Lys Ser Lys Asn Lys
 210 215 220

Leu Glu Val Thr Val Glu Ser His Arg Lys Gly Cys Asp Thr Leu Asp
 225 230 235 240

Ile Ser Val Pro Pro Gly Ser Arg Asn Leu Pro Phe Phe Val Val Phe
 245 250 255

Ser Asn Asp His Ser Ser Gly Thr Lys Glu Thr Arg Leu Glu Leu Arg

260

265

270

Glu Met Ile Ser His Glu Gln Glu Ser Val Leu Lys Lys Leu Ser Lys

275

280

285

Asp Gly Ser Thr Glu Ala Gly Glu Ser Ser His Glu Glu Asp Thr Asp

290

295

300

Gly His Val Ala Ala Gly Ser Thr Leu Ala Arg Arg Lys Arg

305

310

315

<210> 22

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 22

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala

1

5

10

15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu

20

25

30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly

35

40

45

Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys

50

55

60

Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp

65

70

75

80

Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg

85

90

95

Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu
 115 120 125

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu
 130 135 140

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly
 145 150 155 160

Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp
 165 170 175

Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr
 180 185 190

Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg
 195 200 205

Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile
 210 215 220

Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu
 225 230 235 240

Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe
 245 250 255

Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu
 260 265 270

Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp
 275 280 285

Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser
 290 295 300

Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg

305

310

315

<210> 23

<211> 316

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 23

Met Gly Ser Leu Val Leu Thr Leu Cys Ala Leu Phe Cys Leu Ala Ala

1

5

10

15

Tyr Leu Val Ser Gly Ser Pro Ile Met Asn Leu Glu Gln Ser Pro Leu

20

25

30

Glu Glu Asp Met Ser Leu Phe Gly Asp Val Phe Ser Glu Gln Asp Gly

35

40

45

Val Asp Phe Asn Thr Leu Leu Gln Ser Met Lys Asp Glu Phe Leu Lys

50

55

60

Thr Leu Asn Leu Ser Asp Ile Pro Thr Gln Asp Ser Ala Lys Val Asp

65

70

75

80

Pro Pro Glu Tyr Met Leu Glu Leu Tyr Asn Lys Phe Ala Thr Asp Arg

85

90

95

Thr Ser Met Pro Ser Ala Asn Ile Ile Arg Ser Phe Lys Asn Glu Asp

100

105

110

Leu Phe Ser Gln Pro Val Ser Phe Asn Gly Leu Arg Lys Tyr Pro Leu

115

120

125

Leu Phe Asn Val Ser Ile Pro His His Glu Glu Val Ile Met Ala Glu

130

135

140

Leu Arg Leu Tyr Thr Leu Val Gln Arg Asp Arg Met Ile Tyr Asp Gly

145	150	155	160
Val Asp Arg Lys Ile Thr Ile Phe Glu Val Leu Glu Ser Lys Gly Asp			
165	170	175	
Asn Glu Gly Glu Arg Asn Met Leu Val Leu Val Ser Gly Glu Ile Tyr			
180	185	190	
Gly Thr Asn Ser Glu Trp Glu Thr Phe Asp Val Thr Asp Ala Ile Arg			
195	200	205	
Arg Trp Gln Lys Ser Gly Ser Ser Thr His Gln Leu Glu Val His Ile			
210	215	220	
Glu Ser Lys His Asp Glu Ala Glu Asp Ala Ser Ser Gly Arg Leu Glu			
225	230	235	240
Ile Asp Thr Ser Ala Gln Asn Lys His Asn Pro Leu Leu Ile Val Phe			
245	250	255	
Ser Asp Asp Gln Ser Ser Asp Lys Glu Arg Lys Glu Glu Leu Asn Glu			
260	265	270	
Met Ile Ser His Glu Gln Leu Pro Glu Leu Asp Asn Leu Gly Leu Asp			
275	280	285	
Ser Phe Ser Ser Gly Pro Gly Glu Glu Ala Leu Leu Gln Met Arg Ser			
290	295	300	
Asn Ile Ile Tyr Asp Ser Thr Ala Arg Ile Arg Arg			
305	310	315	

<210> 24
 <211> 346
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 24

Met Asp Leu Ser Ala Ala Ala Ala Leu Cys Leu Trp Leu Leu Ser Ala

1 5 10 15

Cys Arg Pro Arg Asp Gly Leu Glu Ala Ala Ala Val Leu Arg Ala Ala

20 25 30

Gly Ala Gly Pro Val Arg Ser Pro Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly

35 40 45

Gly Gly Arg Thr Leu Ala Gln Ala Ala Gly Ala Ala Ala Val Pro Ala

50 55 60

Ala Ala Val Pro Arg Ala Arg Ala Ala Arg Arg Ala Ala Gly Ser Gly

65 70 75 80

Phe Arg Asn Gly Ser Val Val Pro His His Phe Met Met Ser Leu Tyr

85 90 95

Arg Ser Leu Ala Gly Arg Ala Pro Ala Gly Ala Ala Ala Val Ser Ala

100 105 110

Ser Gly His Gly Arg Ala Asp Thr Ile Thr Gly Phe Thr Asp Gln Ala

115 120 125

Thr Gln Asp Glu Ser Ala Ala Glu Thr Gly Gln Ser Phe Leu Phe Asp

130 135 140

Val Ser Ser Leu Asn Asp Ala Asp Glu Val Val Gly Ala Glu Leu Arg

145 150 155 160

Val Leu Arg Arg Gly Ser Pro Glu Ser Gly Pro Gly Ser Trp Thr Ser

165 170 175

Pro Pro Leu Leu Leu Leu Ser Thr Cys Pro Gly Ala Ala Arg Ala Pro

180 185 190

Arg Leu Leu Tyr Ser Arg Ala Ala Glu Pro Leu Val Gly Gln Arg Trp

195

200

205

Glu Ala Phe Asp Val Ala Asp Ala Met Arg Arg His Arg Arg Glu Pro
 210 215 220

Arg Pro Pro Arg Ala Phe Cys Leu Leu Leu Arg Ala Val Ala Gly Pro
 225 230 235 240

Val Pro Ser Pro Leu Ala Leu Arg Arg Leu Gly Phe Gly Trp Pro Gly
 245 250 255

Gly Gly Gly Ser Ala Ala Glu Glu Arg Ala Val Leu Val Val Ser Ser
 260 265 270

Arg Thr Gln Arg Lys Glu Ser Leu Phe Arg Glu Ile Arg Ala Gln Ala
 275 280 285

Arg Ala Leu Gly Ala Ala Leu Ala Ser Glu Pro Leu Pro Asp Pro Gly
 290 295 300

Thr Gly Thr Ala Ser Pro Arg Ala Val Ile Gly Gly Arg Arg Arg Arg
 305 310 315 320

Arg Thr Ala Leu Ala Gly Thr Arg Thr Ala Gln Gly Ser Gly Gly Gly
 325 330 335

Ala Gly Arg Gly His Gly Arg Arg Gly Arg
 340 345

<210> 25

<211> 335

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 25

Met Asp Thr Pro Arg Val Leu Leu Ser Ala Val Phe Leu Ile Ser Phe

1	5	10	15
Leu Trp Asp Leu Pro Gly Phe Gln Gln Ala Ser Ile Ser Ser Ser Ser			
20	25	30	
Ser Ser Ala Glu Leu Gly Ser Thr Lys Gly Met Arg Ser Arg Lys Glu			
35	40	45	
Gly Lys Met Gln Arg Ala Pro Arg Asp Ser Asp Ala Gly Arg Glu Gly			
50	55	60	
Gln Glu Pro Gln Pro Arg Pro Gln Asp Glu Pro Arg Ala Gln Gln Pro			
65	70	75	80
Arg Ala Gln Glu Pro Pro Gly Arg Gly Pro Arg Val Val Pro His Glu			
85	90	95	
Tyr Met Leu Ser Ile Tyr Arg Thr Tyr Ser Ile Ala Glu Lys Leu Gly			
100	105	110	
Ile Asn Ala Ser Phe Phe Gln Ser Ser Lys Ser Ala Asn Thr Ile Thr			
115	120	125	
Ser Phe Val Asp Arg Gly Leu Asp Asp Leu Ser His Thr Pro Leu Arg			
130	135	140	
Arg Gln Lys Tyr Leu Phe Asp Val Ser Met Leu Ser Asp Lys Glu Glu			
145	150	155	160
Leu Val Gly Ala Glu Leu Arg Leu Phe Arg Gln Ala Pro Ser Ala Pro			
165	170	175	
Trp Gly Pro Pro Ala Gly Pro Leu His Val Gln Leu Phe Pro Cys Leu			
180	185	190	
Ser Pro Leu Leu Leu Asp Ala Arg Thr Leu Asp Pro Gln Gly Ala Pro			
195	200	205	

Pro Ala Gly Trp Glu Val Phe Asp Val Trp Gln Gly Leu Arg His Gln
 210 215 220

Pro Trp Lys Gln Leu Cys Leu Glu Leu Arg Ala Ala Trp Gly Glu Leu
 225 230 235 240

Asp Ala Gly Glu Ala Glu Ala Arg Ala Arg Gly Pro Gln Gln Pro Pro
 245 250 255

Pro Pro Asp Leu Arg Ser Leu Gly Phe Gly Arg Arg Val Arg Pro Pro
 260 265 270

Gln Glu Arg Ala Leu Leu Val Val Phe Thr Arg Ser Gln Arg Lys Asn
 275 280 285

Leu Phe Ala Glu Met Arg Glu Gln Leu Gly Ser Ala Glu Ala Ala Gly
 290 295 300

Pro Gly Ala Gly Ala Glu Gly Ser Trp Pro Pro Pro Ser Gly Ala Pro
 305 310 315 320

Asp Ala Arg Pro Trp Leu Pro Ser Pro Gly Arg Arg Arg Arg Arg
 325 330 335

<210> 26
 <211> 381
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 26
 Met Arg Leu Pro Lys Leu Leu Thr Phe Leu Leu Trp Tyr Leu Ala Trp
 1 5 10 15

Leu Asp Leu Glu Phe Ile Cys Thr Val Leu Gly Ala Pro Asp Leu Gly
 20 25 30

Gln Arg Pro Gln Gly Thr Arg Pro Gly Leu Ala Lys Ala Glu Ala Lys

35

40

45

Glu Arg Pro Pro Leu Ala Arg Asn Val Phe Arg Pro Gly Gly His Ser
 50 55 60

Tyr Gly Gly Gly Ala Thr Asn Ala Asn Ala Arg Ala Lys Gly Gly Thr
 65 70 75 80

Gly Gln Thr Gly Gly Leu Thr Gln Pro Lys Lys Asp Glu Pro Lys Lys
 85 90 95

Leu Pro Pro Arg Pro Gly Gly Pro Glu Pro Lys Pro Gly His Pro Pro
 100 105 110

Gln Thr Arg Gln Ala Thr Ala Arg Thr Val Thr Pro Lys Gly Gln Leu
 115 120 125

Pro Gly Gly Lys Ala Pro Pro Lys Ala Gly Ser Val Pro Ser Ser Phe
 130 135 140

Leu Leu Lys Lys Ala Arg Glu Pro Gly Pro Pro Arg Glu Pro Lys Glu
 145 150 155 160

Pro Phe Arg Pro Pro Pro Ile Thr Pro His Glu Tyr Met Leu Ser Leu
 165 170 175

Tyr Arg Thr Leu Ser Asp Ala Asp Arg Lys Gly Gly Asn Ser Ser Val
 180 185 190

Lys Leu Glu Ala Gly Leu Ala Asn Thr Ile Thr Ser Phe Ile Asp Lys
 195 200 205

Gly Gln Asp Asp Arg Gly Pro Val Val Arg Lys Gln Arg Tyr Val Phe
 210 215 220

Asp Ile Ser Ala Leu Glu Lys Asp Gly Leu Leu Gly Ala Glu Leu Arg
 225 230 235 240

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.